

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

**Telómeros y factores de senescencia y muerte celular en cáncer no
microcítico de pulmón y en cáncer colorrectal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Tamara Fernández Marcelo

Directores

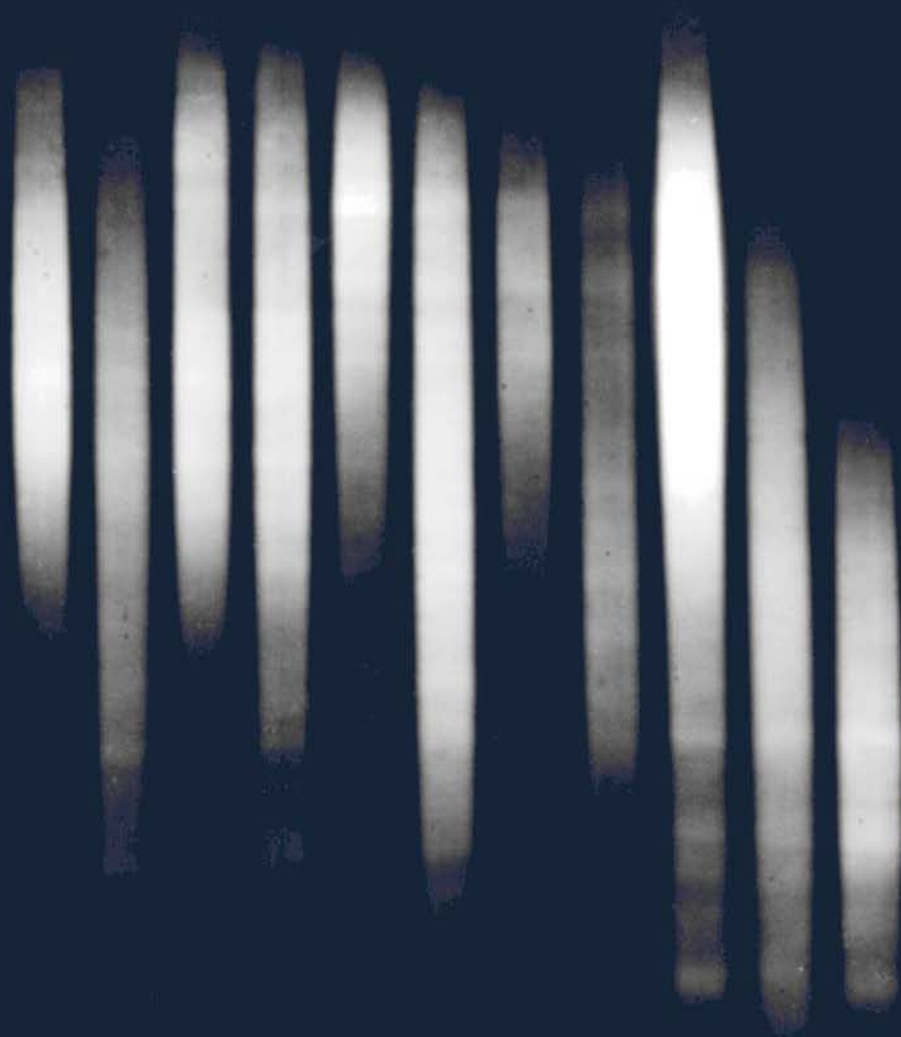
Pilar Iniesta Serrano
Manuel Benito de las Heras

Madrid, 2014



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Telómeros y factores de senescencia y muerte celular en cáncer no microcítico de pulmón y en cáncer colorrectal



TESIS DOCTORAL
Tamara Fernández Marcelo
Madrid, 2014



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

**Telómeros y factores de senescencia y
muerte celular en cáncer no microcítico de
pulmón y en cáncer colorrectal**

TESIS DOCTORAL

TAMARA FERNÁNDEZ MARCELO

MADRID, 2014

Diseño de portada: Víctor González Ruiz
e Irene Pascua García.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Pilar Iniesta Serrano y del Dr. Manuel Benito de las Heras.

Opta al grado de Doctor:

Tamara Fernández Marcelo

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD) mediante la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU); y a los proyectos FIS PI080033, Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña (1782/2008) y RTICC RD06/0020/0021.

Agradecimientos

Gracias a mis Directores de Tesis, la Dra. Pilar Iniesta y el Dr. Manuel Benito, por permitirme formar parte de su grupo de investigación. Gracias Pilar, por la confianza depositada en mí, por tus sinceros ánimos en los momentos difíciles, por buscar tiempo en medio de la vorágine de las clases, Bolonia, alumnos, tutorías, por guiarme cuando el camino no era claro... Ha sido largo, pero lo hemos logrado. Gracias Manuel, por transmitirme tu entusiasmo por la ciencia y por seguir haciendo Ciencia. **Gracias** a los miembros del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Servicio de Cirugía Torácica y Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos, de Madrid, por vuestra colaboración. Y a los Servicios de Inmunología y Experimentación animal del Hospital, por los criostatos prestados. Un montón de gracias a Susana, Elena y Mila: por buscar los bloques que sé os reclamaba con mucha insistencia... **Gracias** a todos los compañeros que han pasado por el laboratorio 36, por compartir fatigas, alegrías y penas. Y muy especialmente a Juan y a Emma, nuestros estudiantes favoritos de máster, por traernos aire fresco cuando más lo necesitábamos. **Gracias**, Carmen y Miguel, bien sabéis que Lyon no hubiera sido lo mismo sin vosotros. Carmen, aún recuerdo aquella tarde, a horas intempestivas, en la que me enseñaste a poner mi primera transferencia.... Gracias por tu sincera compañía.

Gracias a todos los profesores del Departamento, por compartir palabras de ánimo, consejos, sonrisas cómplices, las felicitaciones navideñas, los retratos de vuestros hijos, las historias del pequeño Rafita, el material prestado en los momentos de estrés... En fin, estos casi 7 años en el Departamento no hubieran sido iguales sin vosotros. BBMII no sería lo mismo sin ti Manoli; gracias por regalarnos tu ¡hola guapa/o! cada mañana. **Gracias**, un millón de gracias, a vosotras: Esther, Irene, Jackie, Sabela y Elisa. Qué suerte haberos conocido. Pocas hay tan humildes y buenas como tú, Esther; tan sinceras y auténticas, Irene; tan alegres y joviales, Jackie; frágiles y valientes, Sabela; y mamás tan luchadoras como tú, Elisa. Gracias por las maritonías, las repeladas, por enseñarme que además de los congresos de ciencia también existen los de salsa, las nuevas palabras (chollas o choyas) y poder conocer a Elsa y a Paula ha sido toda una alegría este año. Gracias por estar cuando os he necesitado, por consolarme y regañarme, por compartir mis incertidumbres. Yo sé que lograréis lo que os propongáis, no necesitáis luz para descubrir las sombras. **Gracias** Juan de T., por ser un verdadero ejemplo de trabajo. Y Vanesa, por ser tan natural y hacernos reír a carcajadas.

Gracias a todos los estudiantes de doctorado, máster, fin de grado, becarios de colaboración, que van caminando aprisa por el Departamento con sus ratones, sus membranas, sus placas de PCR, sus geles para revelar. Gracias por demostrarme vuestro entusiasmo por la ciencia, que se siente muy viva. Y muy en especial a María

A., ya veterana en esto de la FPU que tantos quebraderos de cabeza nos ha dado, por las conversaciones compartidas que sólo *oían* las células. Y Ami, tan pequeñita y con tanto coraje, gracias por enseñarme que con tesón y paciencia uno puede lograr lo que se proponga.

Gracias al β -cell Team, Carlos y Alberto, auténticos apasionados de vuestro trabajo, por estar siempre dispuestos a prestar vuestra ayuda, por aportar soluciones ingeniosas, por escuchar pacientemente las dudas, las quejas, las preguntas, “mírame este Western”, “¿me ayudas a mover esta mesa?”; tenéis una gran responsabilidad Ana y Miriam, pero sé que lo haréis muy bien. **Gracias** Víctor, por descubrirme a Papers, Adobe Illustrator... todos unos auténticos desconocidos para mí. Gracias por tu paciencia con mi torpeza informática.

Gracias a la Dra. Giulotto, por acogerme en su laboratorio de Pavía. Y a Rita y Andrés, por hacer mi paso por allí tan ameno. El Dr. Jan Budczies, por arreglar CutOff Finder ante mis insistentes e-mails, la Dra. Rouleau, por enviarme su material desde la punta más bonita del mundo... **Gracias** Rosa y Jesús, por ser tan amables y pacientes cuando cambiábamos las horas de *cuanti* a última hora, por recibirnos siempre con una sonrisa...

Gracias, Dano, Ali e Inés, por entender mis ausencias, por los viajes tan divertidos que hemos compartido, por las risas que me recargaban la energía agotada, por quererme y por decírmelo. Los biólogos luchadores, apasionados de los animales, la bioquímica, la genética... no sé dónde os llevarán los caminos chicos, pero no quiero perderme nada de vuestras vidas. **Gracias** Javi, por compartir conmigo mis desvelos y angustias. Por tu infinita paciencia, es especial, en estos últimos días. Gracias por enseñarme que en la vida no hay protocolos para todo, aunque yo a veces me empeñe y que los no-planes son los mejores. Gracias por los viajes que jamás imaginé que haría, por los momentos vividos. Gracias por escucharme, comprenderme y quererme, como soy. **Gracias** a mis padres, por su inmensa generosidad, por enseñarme a pensar y a ser libre. Tus comidas, aún en el tupper saben igual de ricas y encontrar las *Ventajas de viajar en tren*, disfrutar con una *Suite francesa*, conocer al *Señor Linh* o recordar que ahora es *Tiempo de vida*, no sabes cuánto me han ayudado a tomar distancia cuando lo necesitaba. Gracias por enseñarme que *las cosas bien hechas, bien parecen*; que *quien no lee, no escribe*. Gracias por quererme tanto. Gracias a mi hermana, Paula, todo corazón, porque eres una auténtica luchadora, *Tú eres buena. Tú eres lista. Tú eres importante*. Gracias a tía M. Luisa, por querer a tus niñas como una segunda madre. Y qué suerte haber conocido a mis cuatro abuelos. Gracias a los cuatro por regalarme recuerdos bonitos, canciones, meriendas, y cuentos, *porque los cuentos no son para dormir, son para entender el mundo*. Y en especial, esta Tesis es para y por los que se han enfrentado o se enfrentarán a la batalla del cáncer, enemigo hartó complejo, pero al que no dejaremos de perseguir, aprendiendo y desaprendiendo sus estrategias, para poder vencerlo.

Lo que importa no es la habilidad para evitar los problemas, sino la manera en que se enfrenta uno a ellos cuando se presentan.

Paul Auster, El libro de las ilusiones.

Contenido

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | 1 |
| Antecedentes y Objetivos | 3 |
| 1. Introducción | 5 |
| 1.1. El CÁNCER, la enfermedad expansionista. | 7 |
| 1.2. El cáncer colorrectal. | 9 |
| 1.2.1. Epidemiología y factores de riesgo del cáncer colorrectal. | 9 |
| 1.2.2. Vías de desarrollo del cáncer colorrectal. | 11 |
| 1.3. El cáncer de pulmón. | 16 |
| 1.3.1. Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de pulmón. | 16 |
| 1.3.2. Cáncer microcítico y cáncer no microcítico de pulmón. Modelo de desarrollo del cáncer de pulmón. | 18 |
| 1.3.3. Alteraciones cromosómicas, marcadores moleculares y cambios epigenéticos en el cáncer de pulmón. | 20 |
| 1.4. Los telómeros. | 22 |
| 1.4.1. Longitud y estructura telomérica. | 22 |
| 1.4.2. Las proteínas del complejo <i>shelterin</i> . | 25 |
| 1.4.3. Los telómeros y el problema de la replicación terminal. | 30 |
| 1.4.4. Otras funciones de los telómeros. La cromatina telomérica y la transcripción telomérica. | 33 |
| 1.5. Mecanismos de mantenimiento telomérico. | 36 |
| 1.5.1. La telomerasa. Estructura y regulación de telomerasa. | 36 |
| 1.5.2. Telomerasa, más allá de los telómeros. | 39 |
| 1.5.3. Telomerasa y patologías asociadas. | 40 |
| 1.5.4. Telomerasa en el contexto telomérico. | 41 |
| 1.5.5. La ALTERNativa a telomerasa. | 43 |
| 1.5.6. La terapia antitumoral basada en telomerasa. | 44 |
| 1.6. Función telomérica. Senescencia replicativa, muerte celular y cáncer. | 45 |
| 2. Material y Métodos | 49 |
| 2.1. Pacientes y muestras tisulares. | 51 |
| 2.2. Extracción y valoración del ARN. | 59 |
| 2.3. Extracción y valoración del ADN. | 61 |
| 2.4. Extracción y valoración de proteínas. | 63 |
| 2.5. Determinación de los niveles proteicos de DAPK1 mediante Western-Blot. | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.1. Preparación de las muestras para electroforesis..... | 64 |
| 2.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida. | 64 |
| 2.5.3. Transferencia a membranas de nitrocelulosa. | 65 |
| 2.5.4. Bloqueo e incubación con anticuerpos. | 66 |
| 2.5.5. Detección quimioluminiscente. | 66 |
| 2.6. Determinación de la actividad telomerasa..... | 68 |
| 2.6.1. Elongación y amplificación. | 69 |
| 2.6.2. Detección por ELISA..... | 70 |
| 2.7. Medida de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción. | 72 |
| 2.8. Ensayo de expresión génica con matrices de oligonucleótidos. | 75 |
| 2.8.1. Calidad del ARN y síntesis del ADNc. | 79 |
| 2.8.2. Síntesis, marcaje y amplificación del ARNc. | 81 |
| 2.8.3. Purificación del ARNc. | 81 |
| 2.8.4. Hibridación. | 82 |
| 2.8.5. Lavados..... | 83 |
| 2.8.6. Detección quimioluminiscente. | 83 |
| 2.9. Ensayo de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)..... | 85 |
| 2.9.1. Síntesis del ADN complementario (ADNc), transcripción reversa. | 87 |
| 2.9.2. PCR cuantitativa a tiempo real. | 90 |
| 2.10. Estadística..... | 92 |
| 3. Resultados | 95 |
| 3.1. Estudio de la función telomérica en los tumores no microcíticos de pulmón y su relación con las variables clínico-patológicas. Estudios de pronóstico..... | 97 |
| 3.1.1. La longitud telomérica y la actividad telomerasa. | 97 |
| 3.1.2. La longitud telomérica y su relación con las variables clínico-patológicas. | 99 |
| 3.1.3. La actividad telomerasa y su relación con las variables clínico-patológicas. | 102 |
| 3.1.4. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (I)..... | 103 |
| 3.1.5. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (II)..... | 110 |
| 3.2. Estudio de la función telomérica en los tumores colorrectales y su relación con las variables clínico-patológicas. Estudios de pronóstico..... | 119 |
| 3.2.1. La longitud telomérica y la actividad telomerasa. | 119 |
| 3.2.2. La longitud telomérica y su relación con las variables clínico-patológicas. | 121 |
| 3.2.3. La actividad telomerasa y su relación con las variables clínico-patológicas. | 123 |
| 3.2.4. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (I)..... | 124 |
| 3.2.5. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (II)..... | 129 |

| | |
|--|------------|
| 3.3. Ensayo de expresión génica de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral. Relación con el estatus telomérico. | 132 |
| 3.3.1. Ensayo de expresión con matrices de oligonucleótidos. | 132 |
| 3.3.2. Validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real del ensayo de expresión génica con matrices de oligonucleótidos. | 135 |
| 3.4. Expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral en los CNMPs. | 139 |
| 3.4.1. La expresión génica y el estatus telomérico. | 139 |
| 3.4.2. La expresión génica y la actividad telomerasa. | 145 |
| 3.4.3. La expresión génica y las variables clínico-patológicas. | 146 |
| 3.5. Expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral en los CCRs. | 154 |
| 3.5.1. La expresión génica y la actividad telomerasa. | 154 |
| 3.5.2. La expresión génica y las variables clínico-patológicas. | 155 |
| 4. Discusión | 157 |
| 4.1. La longitud telomérica y la actividad telomerasa en los CNMPs y CCRs. | 160 |
| 4.2. La longitud telomérica, la actividad telomerasa y las variables clínico-patológicas en los CNMPs y CCRs. | 164 |
| 4.3. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica, en los CNMPs y CCRs. | 168 |
| 4.4. Expresión diferencial de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral, en los CNMPs y CCRs. Relación con el estatus telomérico. | 175 |
| 4.5. Expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral en los CNMPs. Relación con la función telomérica y con las variables clínico-patológicas. | 182 |
| 4.6. Expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral en los CCRs. Relación con la función telomérica y con las variables clínico-patológicas. | 185 |
| 5. Conclusiones | 187 |
| 6. Bibliografía | 191 |
| 7. Recursos electrónicos y otros servicios | 221 |
| Summary | 225 |

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

cols.: colaboradores.

dNTPs: desoxinucleósidos trifosfato.

EDTA: ácido etilen-di-amino-tetra-acético.

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

Hinf I: *Haemophilus influenza* R₆, endonucleasa de restricción.

Kb: kilobases.

p/v: peso/volumen.

pb: pares de bases.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*.

rpm: revoluciones por minuto.

Rsa I: *Rhodopseudomonas sphaeroides*, endonucleasa de restricción.

Taq polimerasa: *Thermus aquaticus* polimerasa.

V: voltios.

v/v: volumen/volumen.

Antecedentes y Objetivos

El cáncer es geográfica y étnicamente omnipresente y constituye un grave problema socio-económico. En cada paciente es único y, más que una enfermedad, es un conjunto de muchísimos trastornos de la función de las células y los tejidos. Sin embargo, contamos con nuestros propios procesos de defensa que nos protegen frente a esta patología.

Las células humanas poseen en los extremos de los cromosomas unas estructuras núcleo-proteicas especiales, los telómeros. Constituyen las agujas del reloj mitótico que cuenta las divisiones celulares, pues los telómeros se acortan en cada ciclo de división celular. Cuando llega su tiempo, es decir, cuando los telómeros se han acortado críticamente, las células ponen en marcha los programas de muerte celular y/o senescencia, limitando así la progresión de células genéticamente inestables. A pesar de ello, las células tumorales son capaces de reactivar la enzima que “rejuvenece” a los telómeros, la telomerasa, para garantizar la viabilidad celular. La adquisición de un fenotipo inmortal y el fracaso de los programas que limitan la progresión de células genéticamente inestables, en presencia de telómeros críticamente cortos, se convierte en un escenario peligroso y favorable para las células tumorales. Sin embargo, la funcionalidad de estos programas en respuesta a los telómeros críticamente cortos puede limitar de manera eficiente la progresión del cáncer.

Los programas de senescencia y muerte celular que monitorizan el acortamiento telomérico resultan, por tanto, claves en el contexto tumoral. Su fracaso, o correcto funcionamiento, podría justificar el distinto pronóstico clínico que otorga el estatus telomérico según el tipo tumoral considerado, como así lo han evidenciado los trabajos desarrollados por nuestro grupo de investigación.

En los tumores no microcíticos de pulmón el acortamiento telomérico se asoció de manera significativa con una peor evolución clínica de los pacientes, constituyendo un factor de pronóstico independiente al estadio tumoral (Frías *et al.*, 2008). Sin embargo, el grupo de sujetos afectados de cáncer colorrectal cuyos telómeros exhibían mayores longitudes, presentaron un peor pronóstico clínico, con independencia del estadio tumoral (García-Aranda *et al.*, 2006).

Considerando estos resultados y el importante papel que desempeñan las vías de senescencia y muerte celular en respuesta al acortamiento telomérico, planteamos un proyecto con los siguientes **objetivos**:

1. Validar los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación en relación al pronóstico clínico de pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón y de cáncer colorrectal, considerando el estatus telomérico y la actividad telomerasa.
2. Analizar la expresión diferencial de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral, entre los tumores no microcíticos de pulmón y colorrectales, con acortamiento telomérico.
3. Evaluar si el diferente pronóstico clínico que otorga el estatus telomérico, según el tipo tumoral considerado, se sustenta en una expresión diferencial de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral.
4. Explorar la posible asociación entre los mencionados factores, las variables clínico-patológicas, el estatus telomérico y la actividad telomerasa, en los cánceres no microcíticos de pulmón y colorrectales.

1. Introducción

1.1. El CÁNCER, la enfermedad expansionista.

*El **cáncer** es una enfermedad expansionista: invade tejidos, establece colonias en paisajes hostiles, busca un santuario en un órgano y luego migra a otro. Vive desesperada, inventiva, feroz, territorial, astuta y defensivamente; por momentos, como si nos enseñara a sobrevivir* (Mukherjee, 2012).

Una célula cancerosa es una perversión de una célula normal. Al igual que esta última, la célula cancerosa depende del crecimiento en el sentido más básico y elemental: la división de una célula para formar dos. En los tejidos normales este proceso está delicadamente regulado por señales específicas, unas estimulan el crecimiento y otras, lo detienen. En el cáncer, el crecimiento desenfrenado da origen a una generación tras otra de células. El cáncer es una enfermedad clonalmente evolutiva. Cada generación de células cancerosas da lugar a un pequeño número de células que son genéticamente diferentes a sus progenitores; así, las células más aptas sobreviven: entran en un ciclo de mutaciones, selección y crecimiento excesivo que genera células cada vez más adaptadas a la supervivencia y al crecimiento. Las mutaciones aceleran la adquisición de otras mutaciones, y la inestabilidad genética contribuye a impulsar la generación de clones mutantes. El cáncer explota la lógica fundamental de la evolución como ninguna otra enfermedad (Mukherjee, 2012).

El cáncer es un mal antiguo para el ser humano. El caso número cuarenta y cinco del papiro del médico egipcio Imhotep, que vivió en torno al 2625 a.C., contiene una vívida descripción de lo que pudo ser un cáncer de mama. Y en las *Historias* del historiador griego Heródoto, escritas alrededor del 440 a.C., se menciona el posible cáncer de mama inflamatorio que padeció Atosa, reina de Persia. No obstante, estas son descripciones de lo que pudieron ser auténticas neoplasias, o no. Los únicos casos irrefutables de cáncer en la historia son aquellos que se documentan gracias a la preservación del tejido tumoral. Como el osteosarcoma hallado en la momia perteneciente a una mujer, en la planicie de mil años de antigüedad en el borde septentrional del desierto de Atacama, o el cáncer abdominal de Dakhleh, en Egipto, datado, aproximadamente, del siglo IV d.C. El famoso arqueólogo Louis Leakey descubrió una mandíbula de dos millones de años que tenía los signos de una forma peculiar de linfoma endémico en el sudeste de África (aunque el origen de este tumor nunca se confirmó patológicamente), (Mukherjee, 2012).

El cáncer ha permanecido ausente en la historia médica antigua. La eliminación de otras enfermedades letales, que consumieron durante mucho tiempo a hombres y mujeres, y la prolongación de la vida humana, lo han sacado a la luz. Y sólo un abor-

daje conjunto, en el ámbito científico, médico y tecnológico ayudará a comprender los secretos que encierra bajo su caparazón el *karkinos*¹.

¹Cangrejo. Designación original del cáncer en la literatura médica, data de la época de Hipócrates, alrededor del 400 a.C.

1.2. El cáncer colorrectal.

1.2.1. Epidemiología y factores de riesgo del cáncer colorrectal.

El cáncer de colon o recto es el denominado **cáncer colorrectal (CCR)**. Es el tumor maligno más frecuente en España, si se consideran ambos sexos y la segunda causa de muerte por tumores en España y en los países de la Unión Europea, tras el cáncer de pulmón. Cada semana se diagnostican en España más de 500 casos de CCR. Según los datos del Instituto Nacional de Estadística, en el año 2009 fallecieron en España 14238 personas de cáncer colorrectal, lo que representa alrededor de 260 muertes semanales. En números absolutos, y según la misma fuente, dicha cifra supone un aumento del 2.93% con respecto al año 2008 y del 22% si se compara con la publicada en 1999 (11300 fallecimientos), (Morillas *et al.*, 2012).

En el desarrollo del CCR se han identificado diversos **factores de riesgo, no controlables y controlables por el individuo**. Entre los primeros podemos identificar los siguientes:

La edad. La probabilidad de diagnóstico de cáncer colorrectal aumenta a partir de los 40 años. Así, más del 90% de los casos de cáncer colorrectal se desarrollan en personas con edades en torno a los 50 años o mayores. Sin embargo, el diagnóstico de CCR parece incrementarse entre la población joven: en los Estados Unidos, el cáncer colorrectal se sitúa ahora entre uno de los 10 tipos de cáncer diagnosticados más frecuentemente en hombres y mujeres, con edades comprendidas entre los 20 y 49 años (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

La historia personal: pólipos adenomatosos. Los pólipos neoplásicos (adenomas tubulares y vellosos), en el colon o en el recto, constituyen lesiones precursoras para el desarrollo de cáncer colorrectal. Se estima que es necesario un periodo de latencia de 5 a 10 años para que un adenoma malignice. La detección y resección de un adenoma antes de su transformación maligna puede reducir el riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal. Sin embargo, la resección completa de un pólipo adenomatoso o de un carcinoma localizado se asocia con un aumento en la probabilidad de desarrollo futuro de un cáncer metacrónico², en otro lugar del colon o del recto (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

La historia personal: enfermedad inflamatoria intestinal. Este término se emplea para designar dos patologías: la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. La

² Desarrollo de otro tumor primario en otro sector de la misma mucosa.

primera, provoca la inflamación del colon y del recto. La segunda, causa la inflamación de la pared intestinal en todo su espesor, pudiendo afectar a cualquier parte del tracto digestivo, desde la boca hasta el ano. Estas consecuencias de ambas patologías aumentan el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

La historia familiar: cáncer colorrectal y pólipos adenomatosos. La mayor parte de los casos de cáncer colorrectal aparecen de forma esporádica, en ausencia de una historia familiar de cáncer colorrectal. Sin embargo, más del 20% de los pacientes con cáncer colorrectal poseen parientes afectados por esta enfermedad. Los individuos con una historia familiar de cáncer colorrectal o de pólipos adenomatosos en uno o más parientes de primer grado, tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer colorrectal (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

El riesgo genético heredado. Los síndromes hereditarios (poliposis adenomatosa familiar (FAP, *familial adenomatous polyposis*) y el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC, *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* o síndrome de Lynch)) pueden suponer entre el 5-10% de los cánceres colorrectales. En la actualidad se conocen los genes afectados responsables de estas formas de cáncer colorrectal heredado: las mutaciones en el gen supresor de tumores *APC* (*adenomatous polyposis coli*) se identifican como la causa de la poliposis adenomatosa familiar; mientras que las mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*, implicados en la ruta de reparación del ADN, se relacionan con el cáncer de colon hereditario no polipósico (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

Entre los **factores de riesgo controlables por el individuo**, se reconocen los siguientes:

El estilo de vida: los hábitos dietéticos, la actividad física y la obesidad. La dieta influye profusamente en el riesgo de cáncer colorrectal, así, modificaciones en nuestros hábitos nutricionales podrían reducir en más de un 70% la incidencia de este tipo de cáncer. Las dietas con un alto contenido en grasas, especialmente en grasa animal, constituyen el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal. El consumo elevado de carnes también se identifica como un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer, siendo más acusada la asociación para el cáncer de colon que de recto. Además, algunos estudios sugieren que el riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal aumenta en aquellas personas con una dieta pobre en frutas y verduras (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

La falta de actividad física y el exceso de peso constituyen dos factores de riesgo, estrechamente relacionados, para el desarrollo de cáncer colorrectal: aproximadamen-

te, entre un tercio y un cuarto de los casos de este tipo de cáncer se asocian con ambos factores de riesgo. Así, la práctica de actividad física de forma regular y una dieta saludable pueden contribuir a reducir el riesgo de cáncer colorrectal, aunque la evidencia es más acusada para la prevención del cáncer de colon que de recto (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

El consumo de tabaco y la elevada ingesta de alcohol. El consumo de tabaco resulta ser extremadamente nocivo para el colon y el recto: en torno al 12% de las muertes por cáncer colorrectal se deben a este hábito. Los carcinógenos del tabaco promueven el crecimiento y la formación de pólipos adenomatosos y aumentan el crecimiento tumoral en el colon y en el recto. Además, entre fumadores, la incidencia de cáncer colorrectal tiene lugar a edades tempranas (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

El consumo habitual de alcohol constituye un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal, especialmente entre la población joven. Los metabolitos reactivos del alcohol, como el acetaldehído, pueden tener un papel carcinogénico. Además, ambos factores de riesgo pueden interaccionar: el tabaco induce mutaciones en el ADN que en presencia de alcohol son reparadas de manera ineficiente. El alcohol puede funcionar también como un solvente, favoreciendo la entrada de sustancias carcinógenas en las células de la mucosa intestinal (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

1.2.2. Vías de desarrollo del cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal se desarrolla, típicamente, mediante una serie de sucesos, que comienzan con la transformación del epitelio normal del colon hacia un intermedio adenomatoso (pólipo), y en último lugar a adenocarcinoma, en la denominada “secuencia adenoma-carcinoma” (Morson, 1974). En la actualidad, se acepta que más del 95% de los adenocarcinomas proceden de un adenoma (Andreu, 2011).

En 1990, **Fearon y Vogelstein** (Fearon y Vogelstein, 1990) propusieron por primera vez un **modelo de génesis del cáncer colorrectal**, con una sucesión de eventos genéticos, que ha servido para ejemplificar la progresión de un tumor sólido, (**Figura 1.1**).

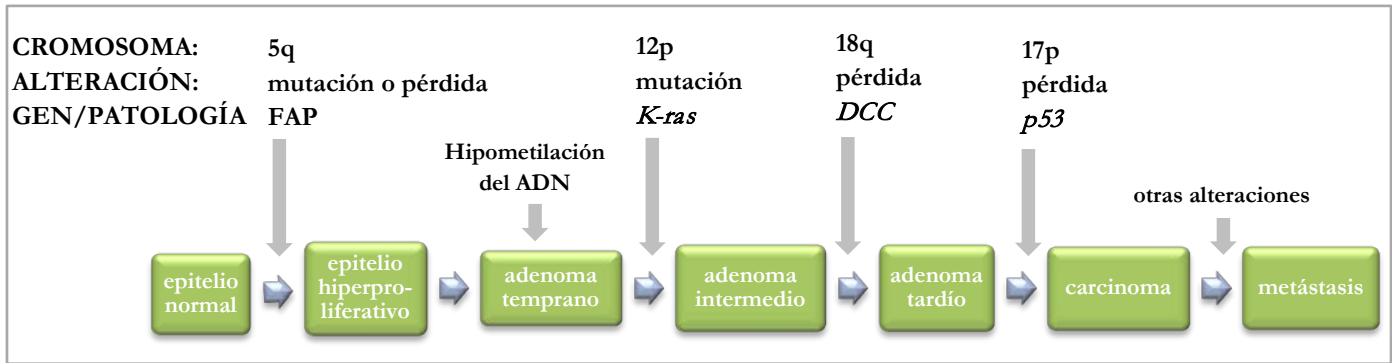


Figura 1.1. Modelo original de Fearon y Vogelstein para la carcinogénesis colorrectal. *FAP*, *familial adenomatous polyposis*; *DCC*, *deleted in colorectal carcinoma*, perdido en el carcinoma colorrectal. Adaptado de Fearon y Vogelstein, 1990.

Según este modelo, la génesis del tumor sucede a través de una serie de alteraciones genéticas, que implican a oncogenes (*K-ras*) y genes supresores de tumores (en concreto, a aquellos localizados en los cromosomas 5q, 12p, 17p y 18q). En pacientes con FAP (poliposis adenomatosa familiar), se hereda una mutación en el cromosoma 5q (gen *APC*, *adenomatous polyposis coli*). La hipometilación se presenta en adenomas muy pequeños, en pacientes con o sin poliposis, esta alteración puede causar aneuploidía y resultar en la pérdida de alelos de genes supresores. Las mutaciones en *K-ras* parecen ocurrir en una célula de un pequeño adenoma pre-existente. Las deleciones alélicas en los cromosomas 17p y 18q generalmente suceden en un estadio más tardío en la tumorigénesis, que las deleciones en el cromosoma 5q o las mutaciones en *K-ras*. Los tumores continúan progresando hasta alcanzar la capacidad para metastatizar y causar la muerte (Fearon y Vogelstein, 1990).

En la actualidad se admite que son **tres** las **rutas no mutuamente excluyentes** (Toyota *et al.*, 1999; Sinicrope *et al.*, 2006 y Shen *et al.*, 2007) las que pueden **conducir** el proceso del **cáncer colorrectal** (Pancione *et al.*, 2012), designadas de acuerdo a los eventos celulares que las promueven:

La **inestabilidad cromosómica (CIN, *chromosomal instability*)**. Aproximadamente, el 70-85% de los cánceres colorrectales se desarrollan mediante esta vía (Grady, 2004). La acumulación numérica o estructural de aberraciones cromosómicas es responsable, en gran parte, de las alteraciones moleculares propias de esta ruta, (**Figura 1.2**), (Rajagopalan y Lengauer, 2004). La primera lesión identificable es la formación de focos de criptas aberrantes. La activación de la ruta de señalización Wnt/ β -catenina sucede en esta etapa como consecuencia de mutaciones en el gen *APC*. La progresión a adenoma tardío y a carcinoma temprano requiere mutaciones activadoras del proto-oncogén *K-ras*, mutaciones en *TP53* y pérdida de heterozigosidad en el cromosoma 18q. La activación mutacional de *PIK3CA* ocurre tarde en esta secuencia adenoma-carcinoma, en una pequeña proporción de cánceres colorrectales. La inestabilidad cromosómica se observa en adenomas benignos y aumenta en paralelo a la progresión tumoral (Pino *et al.*, 2010), (**Figura 1.2**).

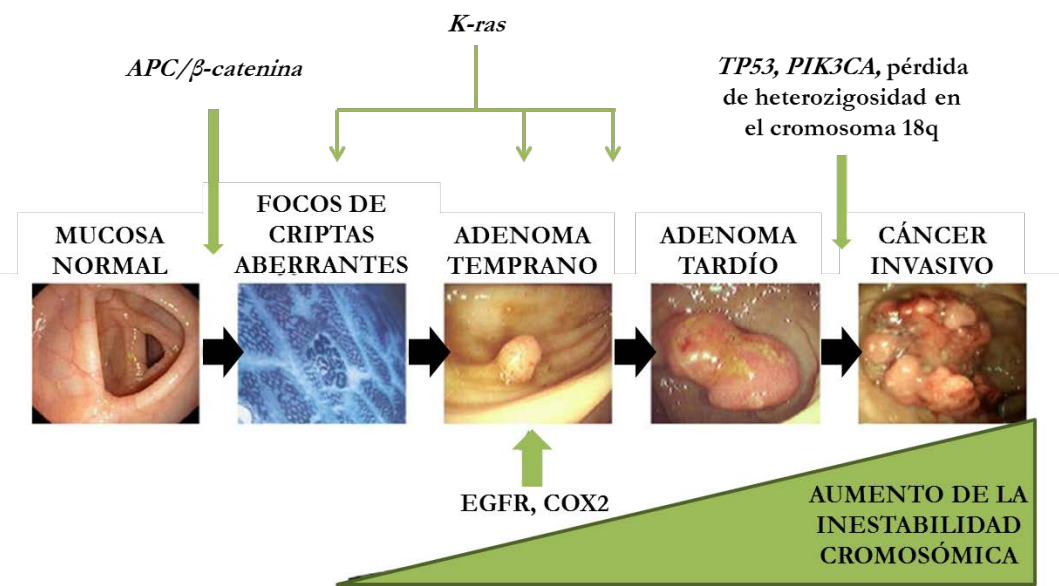


Figura 1.2. Modelo que incluye los eventos genéticos secuenciales en la génesis del cáncer colorrectal, promovido por la inestabilidad cromosómica. *APC*, *adenomatous polyposis coli*; *K-ras*, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; *PIK3CA*, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica α ; *EGFR*, *epidermal growth factor receptor*, receptor del factor de crecimiento epidérmico; *COX2*, ciclooxigenasa 2. Adaptado de Takayama *et al.*, 1998.

La inestabilidad en microsatélites (MSI, *microsatellite instability*). El sustrato genético de la MSI es la inactivación de alguno de los genes reparadores de errores de la replicación del ADN, en particular de la maquinaria de reparación de errores en el apareamiento de las bases del ADN (MMR, *mismatch repair machinery*). Cuando esto ocurre, se acumulan errores en el ADN y se producen gran cantidad de mutaciones por inserciones o deleciones. Los microsatélites son secuencias repetitivas de nucleótidos que existen en el ADN en condiciones normales. Estas secuencias son muy propensas a presentar mutaciones, que habitualmente son reparadas por la maquinaria de reparación de errores. El fallo de esta maquinaria conduce al fenómeno de la MSI (Jover y Payá, 2003). El sistema MMR está compuesto por, al menos, siete proteínas: MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 y PMS2, que se asocian para formar heterodímeros funcionales (Hoeijmakers, 2001).

En 1998, el Instituto Nacional del Cáncer (USA) definió un panel de 5 marcadores microsatélite (**Tabla 1.1**) y los criterios para definir la inestabilidad. Se considera que un tumor presenta inestabilidad en microsatélites o alta inestabilidad en microsatélites (MSI o MSI-H, *MSI-high*) si muestra inestabilidad en 2 o más marcadores y baja (MSI-L, *MSI-low*) si sólo aparece en un marcador (Boland *et al.*, 1998).

| MARCADOR | TIPO | LOCALIZACIÓN |
|----------------|----------------|---------------|
| D2S123 | Dinucleótido | 2p21-2p16 |
| D5S346 | Dinucleótido | 5q21-5q22 |
| D17S250 | Dinucleótido | 17q11,2-17q12 |
| BAT-25 | Mononucleótido | 4q12 |
| BAT-26 | Mononucleótido | 2p16 |

Tabla 1.1. Panel de marcadores microsatélite.

La inestabilidad en las secuencias microsatélite provoca un acusado incremento de los errores genéticos, además, varias secuencias microsatélite se localizan en genes estrechamente relacionados con la carcinogénesis colorrectal, tales como: *MSH3*, *TGFBR2*, *BAX*, *CASP5*, *MSH6*, *CTNNB1*, *APC*, *IGF2*, *E2F4*³, etc (Feldman *et al.*, 2002).

³ *MSH3* (*mutS homolog 3* (*E. coli*)), *TGFBR2* (*transforming growth factor, beta receptor II*), *BAX* (*BCL2-associated X protein*), *CASP5* (*caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase*), *MSH6* (*mutS homolog 6* (*E. coli*)), *CTNNB1* (*catenin (cadherin-associated protein), beta 1*), *APC* (*adenomatous polyposis coli*), *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*), *E2F4* (*E2F transcription factor 4*).

El cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC) se desarrolla a través de esta vía (Worthley y Leggett, 2010), asociado a mutaciones en los genes *MLH1* y *MSH2*. El HNPCC representa el 2-6% de los cánceres colorrectales. Entre la población con mutaciones relacionadas con el HNPCC, el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal oscila entre el 70-80%, y la edad media de diagnóstico se sitúa en torno a los 45 años (revisado por Hagggar y Boushey, 2009).

El fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, *CpG Island Methylator Phenotype*). El CIMP ha sido recientemente admitido como una vía independiente de desarrollo del cáncer colorrectal gracias a la secuenciación completa del metiloma (Xu *et al.*, 2012; Hinoue *et al.*, 2012 y Berman *et al.*, 2012). Después de la ruta de inestabilidad cromosómica, es la segunda vía más frecuente para el desarrollo del CCR esporádico, representando, aproximadamente, el 15% de los CCRs. Constituye un mecanismo mediante el cual se producen modificaciones en la expresión génica (metilación de regiones promotoras), que no vienen acompañadas de cambios en la secuencia del ADN, inactivando así a genes supresores tumorales clave, como *MLH1* (revisado por Worthley y Leggett, 2010).

Se han establecido diversos paneles de marcadores de CIMP (revisado por Panicione *et al.*, 2012), sin embargo aún no se ha definido un panel universal consensuado. En esta categoría de desarrollo de CCR se incluyen a los adenocarcinomas esporádicos con inestabilidad de microsatélites asociada a hipermetilación del promotor del gen *MLH1*. En general, los cánceres colorrectales positivos para el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP-positivos) que presentan alta inestabilidad en las secuencias microsatélite, comparten las características de los CCRs con alta inestabilidad en las secuencias microsatélite, en concreto el pronóstico “relativamente bueno”. Sin embargo, en ausencia de alta inestabilidad en las secuencias microsatélite, los tumores positivos para el fenotipo metilador se asocian con patologías más avanzadas, peor pronóstico clínico y ausencia de infiltración linfocitaria. La lesión precursora de los tumores positivos para el fenotipo metilador son los pólipos aserrados, a diferencia de los CCRs que se desarrollan por la vía CIN y los HNPCC, que se originan a partir de los pólipos adenomatosos (revisado por Worthley y Leggett, 2010).

1.3. El cáncer de pulmón.

1.3.1. Epidemiología y factores de riesgo del cáncer de pulmón.

El **cáncer de pulmón** o carcinoma pulmonar incluye a los tumores epiteliales localizados en el pulmón y excluye a los sarcomas, a los mesoteliomas y a los linfomas (Gazdar, 2010). Es el más frecuente del mundo, con aproximadamente 1400000 nuevos casos al año. Representa el 16.6% de todos los tumores entre los hombres (965000) y el 7.6% entre las mujeres (387000 casos). Las mayores incidencias se observan en Europa (sobre todo en el Este y en el Sur) y en Norteamérica. La relación entre sexos en España es de 9:1, es decir, por cada 9 pacientes con cáncer de pulmón de sexo masculino, hay una paciente de sexo femenino, debido a la tardía adquisición del hábito tabáquico por las mujeres, pues este constituye el principal agente etiológico del cáncer de pulmón (Asociación Española Contra el Cáncer, AECC; información actualizada en junio de 2011). Un 25–50% de los pacientes recibe sólo medicación paliativa. La supervivencia absoluta global del cáncer de pulmón es menor del 10% en muchos países. Entre los pacientes resecaados, la supervivencia a los 5 años ha aumentado ligeramente (Escuín, 2009). Entre las mujeres, la mortalidad debida al cáncer de pulmón se ha incrementado un 50%, desde mediados de la década de los 60 y comienzos de la década del 2000 (Bosetti *et al.*, 2012).

Entre los **factores de riesgo** para el desarrollo del **cáncer de pulmón**, se consideran:

El tabaco: los carcinógenos del tabaco y los fumadores pasivos. El tabaco es el principal agente etiológico del cáncer de pulmón. Este hábito contribuye a la aparición del 80-90% de los casos de cáncer de pulmón en varones y del 55-80% de los casos en las mujeres. Sin embargo, sólo, aproximadamente, el 15% de los fumadores desarrollará un cáncer de pulmón, lo que hace pensar en la posibilidad de una susceptibilidad determinada por la predisposición genética. El humo del tabaco contiene más de 300 sustancias químicas, de las cuales más de 40 son potenciales carcinógenos (**Tabla 1.2**), (revisado por Raposo *et al.*, 2007).

| SUSTANCIA | EFEECTO |
|-------------------------------------|---------|
| Fase partícula | |
| Benzopireno | C |
| Dibenzantroceno | C |
| Nicotina | |
| Nitrosaminas específicas del tabaco | C |
| CAMECOL | |
| No identificadas | PT |
| Residuos | C |
| Níquel | C |
| Cadmio | C |
| Fase gaseosa | |
| Polonio-210 | C |
| Hidracina | C |

Tabla 1.2. Principales agentes mutagénicos, carcinógenos y otras sustancias del humo del tabaco. C, carcinógeno; PT, producto tóxico. Revisado por Raposo *et al.*, 2007.

Dentro de las sustancias carcinógenas más significativas se encuentran la nitrosamina 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, como el benzopireno. La NNK puede inducir mutaciones en el proto-oncogén *K-ras* y aumentar la actividad de la ADN metiltransferasa en los neumocitos tipo II; el primer evento sucede en un 40% de los adenocarcinomas de pulmón y la metilación aberrante del ADN es característica del cáncer de pulmón. Los hidrocarburos aromáticos inducen mutaciones en *TP53*, regulador fundamental del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis, etc. (revisado por Raposo *et al.*, 2007).

El abandono del hábito tabáquico se asocia claramente con una reducción del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, frente a los fumadores activos, haciéndose más patente a los 5 años del abandono. No obstante, el riesgo nunca iguala al de los individuos que nunca han fumado, ni siquiera después de un gran periodo de abstinencia. En cuanto a los fumadores pasivos, presentan valores en orina de carcinógenos específicos del tabaco comprendidos entre el 1-5%, en comparación con los fumadores activos. Los valores en orina de los carcinógenos específicos del tabaco han demostrado ser concordantes con el riesgo relativo de cáncer de pulmón en fumadores activos y pasivos (revisado por Raposo *et al.*, 2007).

Los carcinógenos medioambientales y la contaminación ambiental. La exposición ocupacional a sustancias como el arsénico, el asbesto o los hidrocarburos aromáticos policíclicos explica el 18% de los casos de cáncer de pulmón en los varones y menos del 1% en las mujeres. Otros factores de riesgo reconocidos son: las radiaciones ionizantes, los metales como el cromo o el níquel, compuestos como el formaldehído, la contaminación atmosférica, etc. Diversos estudios han tratado de dilucidar el riesgo de cáncer de pulmón asociado a la exposición a contaminantes ambientales: un estudio norteamericano demostró una relación directa entre la contaminación ambiental y el riesgo de cáncer de pulmón (Dockery *et al.*, 1993), otros estudios reflejaban un aumento del riesgo de cáncer de pulmón en los individuos que vivían en zonas con industrias dedicadas al plomo, cinc o cobre (Blot y Fraumeni, 1975; Xu *et al.*, 1989 y Brown *et al.*, 1984).

La dieta. Los estudios que han tratado de establecer una posible relación entre el consumo de ciertos suplementos vitamínicos y la reducción del riesgo de cáncer de pulmón no han resultado ser demasiado exitosos, al menos hasta la fecha. Así, inicialmente el beta-caroteno se asoció con un menor riesgo de cáncer de pulmón; sin embargo, estudios recientes han demostrado un aumento del riesgo en consumidores de suplementos con beta-caroteno. Además, tampoco parece ser muy evidente si un consumo elevado de frutas, vegetales y algunos micronutrientes podría estar asociado

con un menor riesgo de cáncer de pulmón, en fumadores y no fumadores (Goodman *et al.*, 2004).

Factores genéticos y enfermedad pulmonar benigna preexistente. Aproximadamente, sólo alrededor del 15% de los fumadores desarrollan un cáncer de pulmón, sospechándose la existencia de factores genéticos que predisponen al desarrollo de esta enfermedad. Así, un número considerable de estudios se ha centrado en analizar los polimorfismos genéticos, tanto de expresión como de función, de las enzimas que actúan sobre los carcinógenos del tabaco, la reparación del ADN o la inflamación. Otros trabajos han señalado que los factores mediadores de la inflamación y formación de radicales de oxígeno pueden contribuir a la patogenia del cáncer de pulmón (revisado por Raposo *et al.*, 2007). Se ha demostrado que los pacientes con fibrosis pulmonar difusa tienen un mayor riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón, respecto a la población sana (Turner-Warwick *et al.*, 1980 y Hubbard *et al.*, 2000) y en el caso de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, un estudio prospectivo mostró un mayor riesgo acumulado a los 10 años (Skillrud *et al.*, 1986).

1.3.2. Cáncer microcítico y cáncer no microcítico de pulmón. Modelo de desarrollo del cáncer de pulmón.

Desde el **punto de vista clínico**, básicamente se reconocen **dos tipos de cáncer de pulmón**:

El carcinoma de células pequeñas, o **cáncer microcítico de pulmón (CMP)**, que supone, aproximadamente, entre el 20-25% del número total de casos de cáncer de pulmón. El CMP es uno de los tumores sólidos de crecimiento más rápido y con mayor tendencia a provocar metástasis a distancia y sin tratamiento, su curso es fatal en el plazo de pocas semanas (revisado por Pérez-Gracia *et al.*, 2007).

El **cáncer no microcítico de pulmón (CNMP)**, supone el 75% de los casos de cáncer de pulmón, y se aplica a varios tipos de carcinomas broncogénicos (aquellos que se originan en la pared bronquial), e incluye a los adenocarcinomas, los carcinomas epidermoides y a los carcinomas indiferenciados de célula grande (Medicine-Net.com). Las características de los tipos histológicos se detallan a continuación (**Tabla 1.3**).

| TIPO HISTOLÓGICO | CARACTERÍSTICAS |
|---|---|
| Carcinoma epidermoide o de células escamosas | Se localiza, principalmente, en la parte central de los pulmones y tiende a extenderse hacia las áreas intrabronquiales y peribronquiales; esto puede causar un colapso pulmonar distal y neumonitis obstructiva. |
| Adenocarcinoma | Se localiza en zonas periféricas de los pulmones, y se asocia comúnmente con mutaciones en <i>K-ras</i> . |
| Carcinoma indiferenciado de célula grande | Se presenta frecuentemente como una gran masa periférica con áreas de necrosis prominente. |

Tabla 1.3. Características de los tipos histológicos de CNMP, (Mollberg *et al.*, 2011; Rodenhuis *et al.*, 1988 y Barsky *et al.*, 1994).

Los adenocarcinomas constituyen el grupo de tumores de pulmón más frecuentes (representan entre el 35-50% de todos los cánceres de pulmón) y con mayor complejidad celular. Así, muchos trabajos de investigación se han centrado en explorar el desarrollo de los adenocarcinomas, incluyendo las lesiones precursoras y pre-invasivas. Muchas de las dianas terapéuticas moleculares se dirigen hacia los adenocarcinomas o subtipos de adenocarcinomas (revisado por Cagle *et al.*, 2011). De manera tradicional se considera que los adenocarcinomas pulmonares progresan mediante una secuencia lineal, que incluye múltiples pasos, de forma análoga a la secuencia adenoma-carcinoma de los cánceres colorrectales. De esta forma, la lesión precursora o pre-maligna (hiperplasia adenomatosa atípica, AAH, *atypical adenomatous hyperplasia*) progresa hacia un adenocarcinoma *in situ* pre-invasivo (carcinoma bronquioloalveolar, BAC, *bronchioloalveolar carcinoma*), que precede al adenocarcinoma invasivo y en último lugar, este puede desarrollar la capacidad metastásica hacia otros órganos, (**Figura 1.3**). No obstante, este modelo clásico ha sido reconsiderado, sugiriéndose un nuevo escenario para la progresión de los adenocarcinomas pulmonares, que depende de los cambios genéticos adquiridos (revisado por Yatabe *et al.*, 2011).

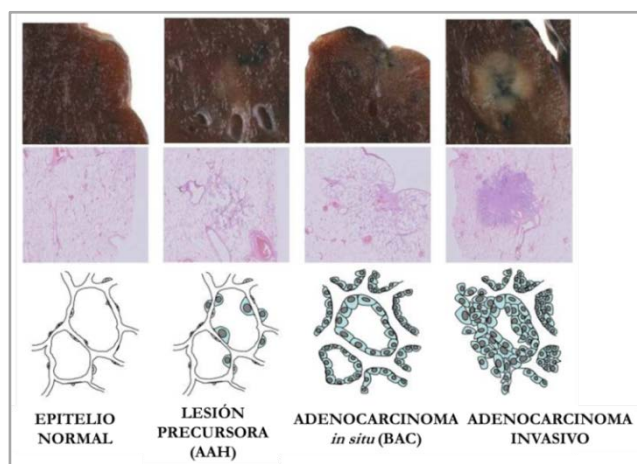


Figura 1.3. Modelo clásico de progresión de los adenocarcinomas pulmonares, Yatabe *et al.*, 2011.

En España, la estirpe epidermoide es la predominante (Escuín, 2009). Las lesiones preneoplásicas de este tipo histológico, incluyen la hiperplasia, la metaplasia escamosa, la displasia y el carcinoma in situ (CIS) (Saccomanno *et al.*, 1974). No obstante, el conocimiento de las alteraciones genéticas de este tipo histológico particular resulta también atractivo, con el fin de mejorar las terapias personalizadas. Así pues, se han identificado algunos genes frecuentemente mutados en este tipo histológico, tales como *TP53*, *GRM8*, *BAI3*, *ERBB4*, *RUNX1T1*, *KEAP1*, *FBXW7* o *KRAS*, entre otros. También se tiene constancia de la amplificación de regiones como 3q26 y 8p12; y se han considerado varios genes candidatos, cuyas alteraciones conducen el proceso tumorigénico en este tipo histológico, y son susceptibles de ser evaluados como dianas terapéuticas (Heist *et al.*, 2012).

1.3.3. Alteraciones cromosómicas, marcadores moleculares y cambios epigenéticos en el cáncer de pulmón.

Tanto los tumores microcíticos, como los no microcíticos de pulmón, son susceptibles de sufrir ciertos tipos de mutaciones, y muchas de las alteraciones génicas son comunes a ambos tipos. En el cáncer de pulmón, las **alteraciones citogenéticas** pueden ser numéricas y estructurales. En relación a estas últimas, las translocaciones no recíprocas y las pérdidas recurrentes que afectan a los cromosomas 1p, 3p, 6q, 9p, 11p, 15p y 17p, provocan cambios en genes supresores de tumores (revisado por Rose-James, 2012). La **metilación aberrante de citosinas** en la región promotora de ciertos genes es uno de los principales mecanismos para modular su expresión, aumentándola o disminuyéndola, en el cáncer de pulmón. Son numerosos los genes cuyo patrón de metilación es susceptible de ser investigado. Entre ellos se incluyen: *p16*, *RASSF1A*, *APC*, *RAR β -2*, *CDH1*, *CDH13*, *DAPK*, *MGMT*, *ASC/TMS1*, *FHIT*, *hSRBC*, *TSLC1*, *DAL-1* y *PTEN*⁴. Las proteínas codificadas por estos genes están implicadas en la regulación del ciclo celular, proliferación, apoptosis, adhesión, motilidad celular y reparación del ADN (revisado por Wen *et al.*, 2011). La metilación de algunos genes se asocia con el hábito tabáquico de los pacientes con cáncer de pulmón. Así, en los adenocarcinomas y en los carcinomas epidermoides de pulmón, la frecuencia de metilación del promotor de ciertos genes es significativamente supe-

⁴ *p16* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, *CDKN2A*), *RASSF1A* (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1), *APC* (adenomatous polyposis coli), *RAR β -2* (retinoic acid receptor, beta), *CDH1* (cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)), *CDH13* (cadherin 13), *DAPK* (death-associated protein kinase 1), *MGMT* (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase), *ASC/TMS1* (PYD and CARD domain containing), *FHIT* (fragile histidine triad), *hSRBC* (protein kinase C, delta binding protein), *TSLC1* (cell adhesion molecule 1), *DAL-1* (erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3) y *PTEN* (phosphatase and tensin homolog).

rior entre los fumadores, respecto a los individuos que nunca han fumado (Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Vaissière *et al.*, 2009 y Buckingham *et al.*, 2010). Y por el contrario, entre los individuos no fumadores con cáncer de pulmón, se observa un perfil de metilación distinto al de los fumadores (Kaira *et al.*, 2007 y Tessema *et al.*, 2009). Por tanto, el consumo de tabaco parece promocionar la metilación de ciertos genes. La metilación génica en el cáncer de pulmón también ha sido objeto de estudio para la detección temprana, la identificación de grupos de riesgo y el establecimiento de la progresión y el pronóstico de la enfermedad (revisado por Wen *et al.*, 2011). Las ADN metiltransferasas (DNMTs, *DNA methyl-transferases*), DNMT1, DNMT3a y 3b se hallan sobre-expresadas en el cáncer de pulmón, en particular en los fumadores (Lin *et al.*, 2007). Además, en el caso de DNMT1 y DNMT3b, el incremento de su expresión se asocia de manera significativa con una peor evolución clínica de los pacientes (Lin *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2010 y Xing *et al.*, 2008). La **pérdida de la impronta**⁵ (revisado por Lacadena, 1996) o la **hipometilación** en la región promotora representa también un mecanismo para la activación de oncogenes, tales como *ILGF2* (*insulin-like growth factor 2*), *PEG1/MEST* (*mesoderm specific transcript*) y *H19* (*imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)*), en el cáncer de pulmón (Jarrard *et al.*, 1995 y Nakanishi *et al.*, 2004). Las **polisomías**, o regiones de amplificación génica, afectan a proto-oncogenes como el *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) y *MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*), (Miura *et al.*, 1992 y Testa y Siegfried, 1992).

En la **clínica del cáncer de pulmón** es manifiesta la **utilidad de los marcadores moleculares**. Por ejemplo, los tumores no microcíticos de pulmón se han dividido en varios subgrupos basados en las *mutaciones conductoras*, aquellas que desempeñan un papel crucial en la biología del cáncer, como las que implican a *KRAS*, *EGFR*, *EML4-ALK*, *HER2*, *BRAF*, *Met*, *PKB/AKT1*, *PI3KCA*⁶, entre otras; y además, las mutaciones en *EGFR* permiten establecer tres subgrupos: 1) mutaciones en *EGFR* asociadas con sensibilidad a fármacos, 2) mutaciones en *EGFR* asociadas con resistencia primaria a fármacos y 3) mutaciones en *EGFR* asociadas con resistencia adquirida a fármacos (Pao y Girard, 2011). La caracterización molecular de los tumores es la base de la terapia personalizada, que permite “administrar el tratamiento adecuado a un paciente concreto y en el tiempo preciso”.

⁵ La impronta genómica se define como una modificación epigenética del genoma, que depende del origen del gameto transmisor.

⁶ *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), *EML4-ALK* (*echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*), *HER2* (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*), *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), *Met* (*mesenchymal epithelial transcription factor*), *PKB/AKT1* (*protein kinase B*), *PI3KCA* (*phosphatidylinositol 3 kinase catalytic subunit*).

1.4. Los telómeros.

Los extremos de los cromosomas lineales están constituidos por un gran complejo núcleo-proteico especial, distinto al resto de la cromatina: **los telómeros** (Blackburn, 1994). Barbara McClintock, trabajando con maíz, y Herman Muller, en su trabajo con la mosca de la fruta (revisado por Varela y Blasco, 2010) propusieron por primera vez en la década de los 30, que los extremos de los cromosomas juegan un importante papel garantizando la estabilidad cromosómica. Ambos investigadores establecieron que los extremos cromosómicos poseían estructuras especiales requeridas para la estabilidad cromosómica. Muller acuñó el término telómero del griego, *telos* (fin) y *meros* (parte). McClintock señaló que sin estas estructuras finales especiales, los cromosomas podrían fusionarse y romperse en mitosis, y observó que el resultado de la inestabilidad cromosómica era perjudicial para las células. Estos estudios pioneros establecieron que los telómeros funcionales son requeridos para proteger los extremos de los cromosomas, proporcionar estabilidad cromosómica y asegurar una fiel segregación del material genético entre las células hijas tras la división celular (revisado por Aubert *et al.*, 2008). Varias décadas después, diferentes técnicas moleculares mostraron que los extremos de los cromosomas consistían en un tándem repetitivo de secuencias ricas en guanina (**Figura 1.4**), (Blackburn, 1994).

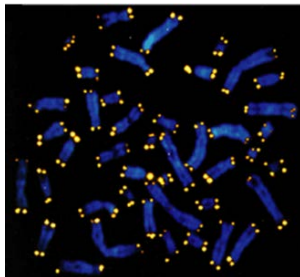


Figura 1.4. Extremos cromosómicos de células en metafase. Los cromosomas (azul) están teñidos con DAPI (diclorohidrato de 4', 6-diamino-2-fenilindol). Los telómeros han sido hibridados con una sonda fluorescente (amarilla) específica para las secuencias teloméricas, Hodes *et al.*, 2002.

1.4.1. Longitud y estructura telomérica.

En la población humana *normal*, la **longitud de los telómeros** es heterogénea, y oscila entre las 5 y 15 Kb. La longitud telomérica está influenciada por factores genéticos y ambientales (Samassekou *et al.*, 2010).

La **longitud de los telómeros varía** entre órganos, tejidos y células, como lo demostró uno de los primeros estudios que comparó la longitud telomérica entre hígado fetal (≈ 13 Kb), células de sangre de cordón umbilical (≈ 12 Kb) y médula ósea de adulto (≈ 8.5 Kb), desarrollado en el año 1994 por Vaziri y cols. (Vaziri *et al.*, 1994).

Otros grupos han evaluado la variación de la longitud telomérica entre individuos de distintas edades, evidenciando que el ritmo de acortamiento telomérico es superior en algunos tejidos, debido a la capacidad proliferativa de las células, los mecanismos celulares específicos de mantenimiento telomérico, o bien, el microambiente celular (Takubo *et al.*, 2002). Además, algunos trabajos han demostrado que existen diferencias en la longitud media de los telómeros entre los diferentes tipos celulares pertenecientes a un mismo tejido, como sucede entre las subpoblaciones leucocitarias (Hoffmann *et al.*, 2009; Martens *et al.*, 2002; Rufer *et al.*, 1998 y Rufer *et al.*, 1999). Las células *stem* presentan telómeros más largos que las células progenitoras, como lo han puesto de manifiesto varios trabajos (Flores *et al.*, 2008; Ziffle *et al.*, 2003 y Vaziri *et al.*, 1994). La longitud telomérica también varía entre los cromosomas de una misma célula: los telómeros de los brazos cromosómicos 17p, 19p y 20q han resultado ser los más cortos, mientras que los de los cromosomas 5p, 3p, 4q y 1p presentan los telómeros más largos (Martens *et al.*, 1998; Mayer *et al.*, 2006; Perner *et al.*, 2003 y Samassekou *et al.*, 2009). Incluso, se ha demostrado la existencia de variaciones en la longitud telomérica entre los brazos de cromosomas homólogos (Londoño-Vallejo *et al.*, 2001 y Surrallés *et al.*, 1999). La variabilidad de la longitud telomérica entre individuos parece estar determinada genéticamente (Slagboom *et al.*, 1994), sin embargo, aún no ha sido clarificado si la herencia está ligada al cromosoma X (Nawrot *et al.*, 2004) o bien es paterna (Njajou *et al.*, 2007; Nordfjäll *et al.*, 2005 y Nordfjäll *et al.*, 2010). Los *loci* localizados en 3p26.1, 10q26.13, 12q12.22 y 14q23.2 han sido asociados con la regulación de la longitud telomérica (Andrew *et al.*, 2006; Mangino *et al.*, 2008 y Vasa-Nicotera *et al.*, 2005), y el *locus* 3q26, localizado en las proximidades del gen del componente ARN de la telomerasa⁷, también se ha relacionado con el control de la longitud telomérica (Codd *et al.*, 2010). Finalmente, es preciso indicar que, además del componente genético, ciertos factores ambientales como la obesidad, el hábito tabáquico o el estrés se han relacionado negativamente con la longitud telomérica (Collins *et al.*, 2003; Epel *et al.*, 2004; Epel, 2009; Simon *et al.*, 2006 y Valdes *et al.*, 2005).

Los telómeros funcionales constituyen estructuras estables que no sufren procesos de degradación, recombinación o fusión con otros extremos cromosómicos; y no son reconocidos por los sistemas celulares que identifican el daño en el ADN, a pesar de que el extremo cromosómico constituye un corte en la doble hebra de ADN (Sandell y Zakian, 1993). En cuanto a su **estructura**, el ADN telomérico, en los organismos eucariotas, está integrado por secuencias cortas y repetitivas, que contienen grupos de tres o más guaninas (G) en la hebra que constituye el extremo 3' de los cromosomas,

⁷ La enzima telomerasa es una ADN polimerasa capaz de catalizar la adición de nuevas unidades de repeticiones teloméricas, TTAGGG, en aquellos tipos celulares en los que se expresa (véase más adelante).

también denominada hebra rica en guanina (*G-rich strand*), (Greider y Blackburn, 1985). En humanos, la secuencia repetitiva es: 5'TTAGGG/CCCTAA3' (Meyne *et al.*, 1989), (**Figura 1.5**).



Figura 1.5. Representación esquemática de la secuencia telomérica.
Adaptado de Tropp, 2011 y Lundblad, 2000.

La hebra rica en guanina del ADN telomérico presenta un extremo sobresaliente de unos 200 nucleótidos (Wright *et al.*, 1997) a consecuencia del problema de la replicación terminal⁸ (Gomez *et al.*, 2012). Este extremo sobresaliente puede formar complicadas estructuras, en las que cuatro bases de guanina constituyen una tétrada, y varias tétradas superpuestas, que interaccionan mediante enlaces de hidrógeno de Hoogsteen, constituyen el *G-cuadruplex* (Zvereva *et al.*, 2010 y Hänsel *et al.*, 2011), (**Figura 1.6**). La formación de tales estructuras en los telómeros puede suponer un problema para la replicación del ADN y para la actuación de telomerasa (Gomez *et al.*, 2012).

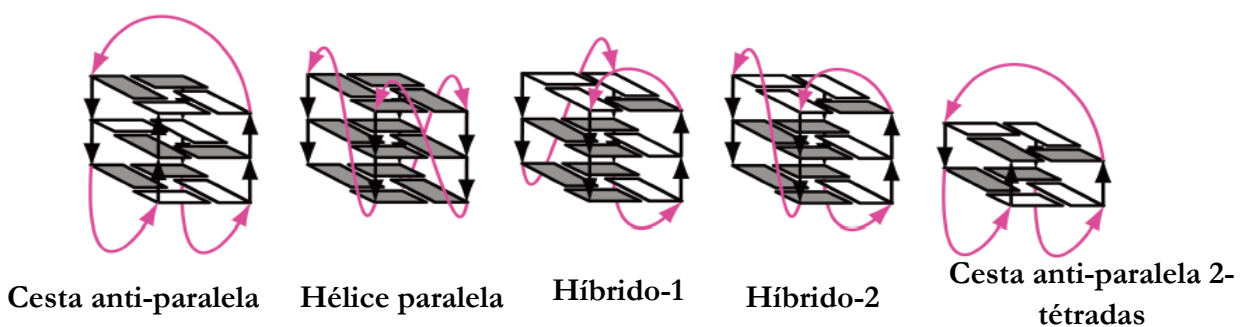


Figura 1.6. Representación esquemática de las estructuras *G-cuadruplex* intramoleculares, formadas por cuatro repeticiones teloméricas en humanos. Los bucles se representan en color magenta, y las guaninas en conformación *anti* y *syn*, se representan en colores gris y blanco, respectivamente. Adaptado de Hänsel *et al.*, 2011.

⁸ Este concepto hace alusión a la incapacidad de las ADN polimerasas convencionales para copiar toda la secuencia de ADN en el extremo 3', una vez eliminada la secuencia molde. Como resultado se produce la pérdida de un fragmento del extremo cromosómico en cada ciclo de replicación.

Los telómeros forman grandes estructuras serpenteantes. El ADN telomérico se vuelve sobre sí mismo formando una estructura en forma de bucle, o lazo, denominada bucle T, estabilizado por las proteínas de unión al telómero. El extremo 3' protuberante de la hebra rica en guanina invade la doble cadena de repeticiones teloméricas, formando otro bucle, o bucle de desplazamiento, el bucle D (revisado por Gomez *et al.*, 2012 y Boticario y Cascales, 2009), (**Figura 1.7**).

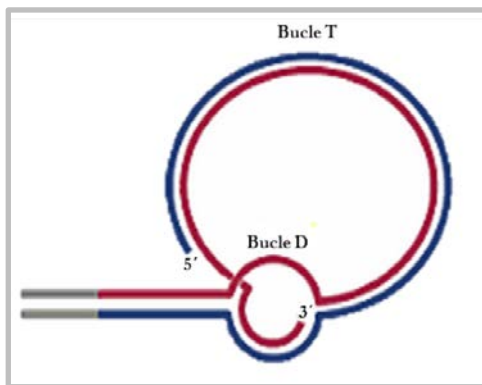


Figura 1.7. Representación esquemática de la conformación espacial del telómero. Adaptado de Tropp, 2011 y Lundblad, 2000.

Esta estructura compleja representa la primera barrera de protección de los extremos cromosómicos. La pérdida de la protección telomérica, bien por la pérdida de las secuencias repetidas o de las proteínas de unión al telómero, conduce a procesos de fusión de los extremos cromosómicos, y finalmente, a la pérdida de la viabilidad celular (revisado por Blasco, 2005).

1.4.2. Las proteínas del complejo *shelterin*.

En los humanos, **un conjunto de seis proteínas está unido al ADN telomérico**, constituyendo **el complejo *shelterin***, compuesto por: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 y POT1 (Palm y de Lange, 2008). Este complejo evita la activación de la maquinaria de respuesta al ADN dañado (*DNA damage response*, DDR), a nivel telomérico y participa en la regulación de la actividad telomerasa, a nivel de los extremos cromosómicos también (Martínez y Blasco, 2011), (**Figura 1.8**).

En células humanas, la primera proteína identificada fue **TRF1** (proteína de unión a las repeticiones teloméricas, *telomeric repeat binding factor 1*), (Chong *et al.*, 1995). El dominio C-terminal de esta proteína reconoce específicamente al ADN telomérico y requiere de la formación de un dímero para unirse firmemente a él. TRF1 es un regulador negativo de la elongación del telómero (Smogorzewska *et al.*, 2000). **TRF2** (proteína de unión a las repeticiones teloméricas, *telomeric repeat binding factor 2*) tam-

bién es un regulador negativo del alargamiento telomérico (Smogorzewska *et al.*, 2000) y estabiliza el extremo sobresaliente de la hebra rica en guanina, evitando fusiones cromosómicas. La sobre-expresión de un mutante dominante negativo de TRF2 puede causar senescencia prematura (Steensel *et al.*, 1998), y la activación de la cascada de señales apoptóticas mediadas por ATM y p53 (Karlseder *et al.*, 1999). Ambas, TRF1 y TRF2, no permiten la acción de telomerasa, restringiendo o inhibiendo de esta forma el alargamiento telomérico y participan en dos rutas importantes (ATM, *ataxia telangiectasia mutated* y ATR, *ataxia telangiectasia and Rad3 related*), sensores del daño en el ADN. Las quinasas ATM y ATR, que señalizan el ADN dañado, son capaces de inducir la puesta en marcha de esta vía a nivel telomérico, si la funcionalidad del complejo *shelterin* está comprometida o los telómeros alcanzan una longitud crítica (revisado por Gomez *et al.*, 2012 y Martínezy Blasco, 2011).

La proteína TRF2 recluta en los telómeros humanos a **RAP1** (proteína represora/activadora 1, *repressor/activator 1*), (Li *et al.*, 2000). RAP1 es prescindible para la formación de la protección telomérica (*telomere capping*), como se demostró constatan-do la viabilidad de los ratones carentes del gen *RAP1*, en el trabajo de Martínez y cols. (Martinez *et al.*, 2010), sin embargo, sí evita la recombinación y fragilidad telomérica (Martinez *et al.*, 2010). Además de su papel en relación a los telómeros, interacciona también con regiones extra-teloméricas, mediante el reconocimiento de la secuencia consenso (TTAGGG)₂, en concreto, las regiones subteloméricas⁹ (Blasco, 2007) constituyen lugares enriquecidos en RAP1 (Martinez *et al.*, 2010). También parece desempeñar un papel como modulador en la ruta mediada por el factor nuclear NF-kappa β (Teo *et al.*, 2010) y participa en la regulación transcripcional de algunos genes (revisado por Kabir *et al.*, 2010).

TIN2 (factor nuclear 2 de interacción con TRF1, *TRF1-interacting nuclear factor 2*), modula la poli(ADP)-ribosilación¹⁰ (Cook *et al.*, 2002) de TRF1, dependiente de tankirasa 1 (TANK1), alterando la unión de TRF1 a las repeticiones teloméricas. De esta manera parece que se controla la elongación del telómero regulando el acceso de telomerasa al mismo. TIN2 también co-localiza con dominios de heterocromatina, no teloméricos, mediante su interacción con HP1 γ (*chromobox* homólogo 5, *chromobox protein homolog 5*). Miembro de la familia de proteínas de la heterocromatina, capaz de unirse a las histonas y a proteínas no histonas (NCBI), (revisado por Blasco, 2005).

⁹ Las regiones subteloméricas, adyacentes a los telómeros, son ricas en secuencias repetidas de ADN y contienen una baja densidad de genes.

¹⁰ La poli(ADP)-ribosilación es una modificación post-traduccion que consiste en la adición de una cadena de ADP-ribosas. Produce una disminución significativa en la afinidad de TRF1 por el ADN telomérico, resultando en la ubiquitinización y posterior degradación proteosómica de la proteína.

telomérico TRF1. La incorporación de unidades de ADP-ribosa a TRF1 por Tankirasa 1, elimina este estado reprimido y permite el acceso de telomerasa a los telómeros, (**Figura 1.9**). Tankirasa 1 también se requiere para la resolución de los complejos de cohesión que se forman entre telómeros hermanos (revisado por Hsiao y Smith, 2008).

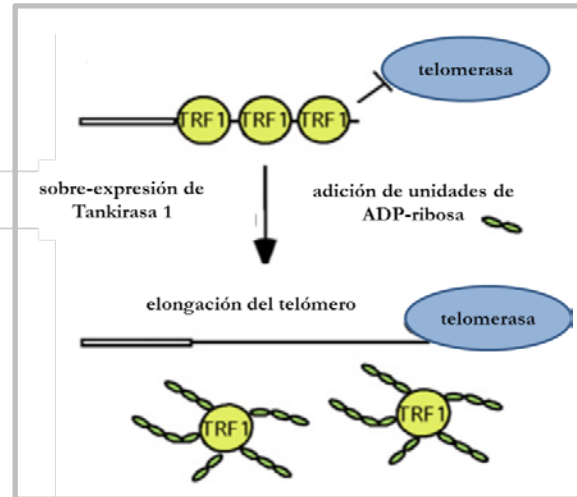


Figura 1.9. Tankirasa 1 como regulador positivo de la longitud telomérica.
Adaptado de Hsiao y Smith, 2008.

Tankirasa 1 tiene un homólogo muy próximo, **Tankirasa 2**: la sobre-expresión de Tankirasa 2 en el núcleo provoca la retirada de TRF1 de los telómeros, y a largo plazo conduce a la elongación del telómero dependiente de su actividad catalítica de poli(ADP)-ribosilación (revisado por Hsiao y Smith, 2008).

PINX1 (inhibidor de telomerasa 1, de interacción con PIN2/TRF1, *PIN2/TERF1 interacting, telomerase inhibitor 1*) interacciona con TRF1. Esta unión es altamente específica y no se ha detectado asociación con TRF2 (Chen *et al.*, 2008). El trabajo de los Doctores Xiao Zhen Zhou y Kun Ping Lu ha puesto de manifiesto que PINX1 y su dominio TID (dominio inhibidor de telomerasa, *telomerase inhibitory domain*) se unen a la subunidad catalítica de telomerasa, hTERT (subunidad catalítica con actividad transcriptasa inversa, *human Telomerase Reverse Transcriptase*) e inhiben su actividad. La sobre-expresión de PINX1 o de TID inhibe la actividad telomerasa, provoca acortamiento telomérico e induce al estado de crisis¹¹ (Shay y Wright, 2005); mientras que la disminución de PINX1 endógeno aumenta la actividad telomerasa y provoca elongación de los telómeros (Zhou y Lu, 2001).

Apollo es una nucleasa reclutada a los telómeros por TRF2. Procesa los extremos cromosómicos generados a partir de la hebra conductora durante la replicación del ADN, creando una estructura terminal que evita la activación de ATM y resiste a las uniones de extremos cromosómicos (Wu *et al.*, 2010).

¹¹ El estado de crisis o M2 se caracteriza por una abundancia de extremos cromosómicos desprotegidos, fusiones de los extremos cromosómicos, ciclos de rotura-fusión-puente, mitosis catastróficas y gran fracción de células apoptóticas.

El **complejo heterotrimérico MRN** está integrado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1. En humanos se asocia con los telómeros a través de su interacción con TRF2 (Lombard y Guarente, 2000 y Zhu *et al.*, 2000). Es reclutado a las roturas de doble hebra para poner en marcha mecanismos de reparación del ADN (Jackson, 2002 y Valerie y Povirk, 2003) y se requiere para el mantenimiento de la integridad telomérica en mamíferos, insectos y plantas (Kironmai y Muniyappa, 1997; Boulton y Jackson, 1998; Gallego y White, 2001; Ranganathan *et al.*, 2001; Bi *et al.*, 2004 y Ciapponi *et al.*, 2004). Está implicado en la generación del extremo 3' sobresaliente en telómeros humanos (Chai *et al.*, 2006).

Las proteínas **PNUTS** (subunidad que dirige a la proteína fosfatasa 1 al núcleo, *phosphatase nuclear targeting subunit*) y **MCPH1** (microcefalina 1, *microcephalin 1*) interactúan directamente con TRF2, y pueden regular la longitud telomérica y la respuesta al ADN dañado, respectivamente (Kim *et al.*, 2009).

Las proteínas **WRN** (helicasa del síndrome de Werner, *Werner syndrome, RecQ helicase-like*) y **BLM** (helicasa del síndrome de Bloom, *Bloom syndrome, RecQ helicase-like*) miembros de la familia de las helicasas RecQ, interactúan con TRF2. Esta interacción estimula de manera notable su actividad helicasa y desenrollan largas regiones teloméricas pre-unidas a TRF2 (Opresko *et al.*, 2002). TRF2 también está físicamente unido a la **endonucleasa Flap 1** (FEN-1), (Muftuoglu *et al.*, 2006) y es requerido para la replicación de la hebra retardada de los telómeros, así como para re-iniciar de manera eficiente las paradas en la horquilla de replicación (Saharia *et al.*, 2010).

El complejo de reconocimiento del origen de replicación, **ORC** (*origin recognition complex*) es también reclutado a los telómeros por TRF2 y es importante para el mantenimiento de la función telomérica (Atanasiu *et al.*, 2006). El complejo de nucleasas **ERCC1-XPF** (*excision repair cross complementing 1/ xeroderma pigmentosum group F*) participa en el procesamiento de la hebra sencilla rica en guaninas y está implicado en la regulación de la integridad telomérica (revisado por Gomez *et al.*, 2012). El **heterodímero Ku70/Ku86**, componente central de la recombinación no homóloga, desarrolla un papel importante en relación a la funcionalidad telomérica: protege a los telómeros frente la degradación y la recombinación inter-cromosómica; y también participa en la regulación de telomerasa (Riha *et al.*, 2006).

1.4.3. Los telómeros y el problema de la replicación terminal.

La protección telomérica es clave para amortiguar la pérdida de material genético en cada ronda de división celular, por el denominado “**problema de la replicación terminal**”. En el año 1972, James Watson escribió: *mientras que el crecimiento orientado en dirección 5' hacia 3' debería avanzar de manera fluida hasta el final de la hebra molde, no veo una manera simple para que el crecimiento en dirección 3' hacia 5', alcance el extremo 3' de su hebra molde* (Watson, 1972). Efectivamente, las ADN polimerasas convencionales son incapaces de replicar de manera completa las moléculas de ADN lineales, este es el denominado problema de la replicación terminal. Las ADN polimerasas copian el ADN en dirección 5'→3' y no puedan comenzar la síntesis *de novo*; por eso emplean pequeños fragmentos de ARN como cebadores. La denominada hebra conductora puede ser sintetizada de manera continua, sin embargo, la hebra retardada se sintetiza en forma de pequeños fragmentos de ADN (fragmentos de Okazaki), cebados por ARN. Una vez completada la síntesis, los cebadores de ARN son eliminados y los fragmentos de ADN, ligados. La eliminación del cebador más distal en el extremo 5' da lugar a un hueco de unas 8-12 nucleótidos, causando, por tanto, la pérdida de material genético terminal cada vez que la célula replica su ADN (revisado por Vega *et al.*, 2003). Esta replicación del ADN da lugar a un producto de extremos romos, a partir de la síntesis de la hebra conductora que requiere una digestión nucleolítica en dirección 5'→3' para generar el extremo 3' sobresaliente y permitir la formación de la estructura telomérica. El producto de la síntesis de la hebra retardada presenta un pequeño extremo sobresaliente, tras la eliminación del cebador, que parece ser suficiente para configurar una estructura telomérica funcional (revisado por Verdun y Karlseder, 2007), (**Figura 1.10**).

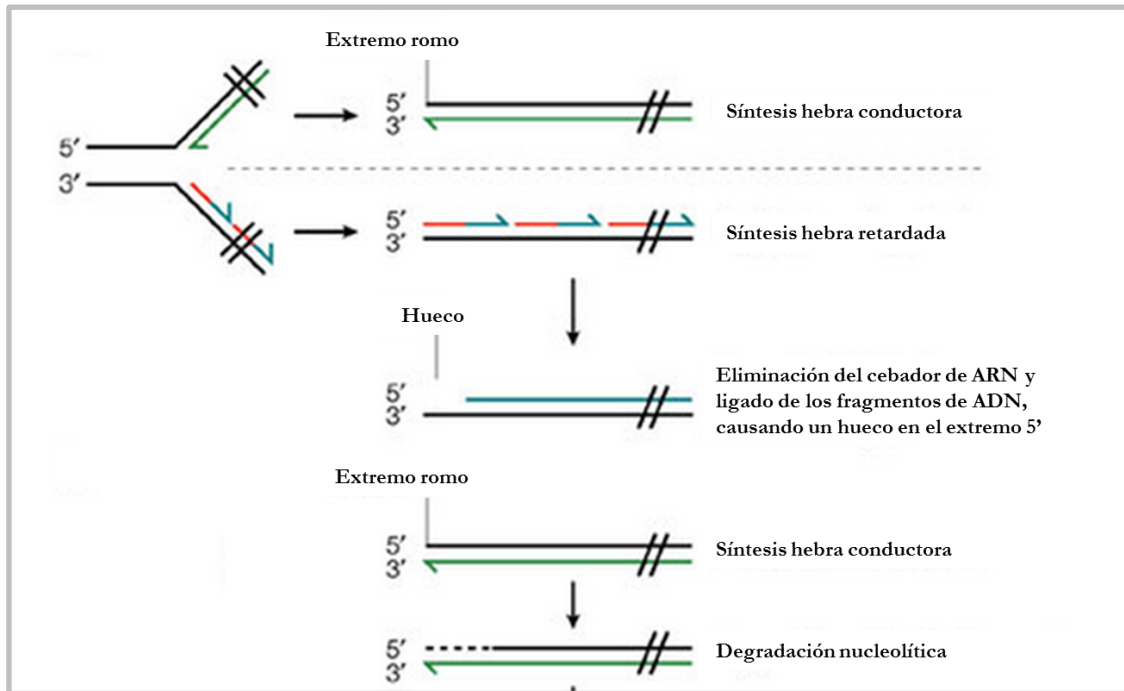


Figura 1.10. El problema de la replicación terminal y el procesamiento de los extremos cromosómicos. Adaptado de Vega *et al.*, 2003.

En cada división celular, los telómeros se acortan a causa del problema de la replicación terminal y del procesamiento de los extremos cromosómicos por nucleasas (revisado por Samassekou *et al.*, 2010). Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, o se altera el complejo núcleo-proteico, son reconocidos como puntos de ADN dañado y provocan la muerte de la célula o la entrada en senescencia. En células humanas, las vías dependientes de p53 y RB (retinoblastoma) son las responsables de monitorizar la disfunción telomérica (revisado por Samassekou *et al.*, 2010 y Verdun y Karlseder, 2007). Las células que continúan dividiéndose y superan su límite replicativo normal, pierden la protección telomérica residual y entran en el estado de crisis, caracterizado por una inestabilidad genómica masiva y muerte celular. Algunos clones de células transformados emergen, y aunque la activación de telomerasa no es esencial para la adquisición de un fenotipo transformado, muchas células que escapan de manera exitosa del estado de crisis, han reactivado la actividad telomerasa. La reactivación de la enzima en células con telómeros críticamente cortos permite el establecimiento de clones inmortales y genéticamente inestables, evento que constituye un paso clave para el desarrollo del cáncer. Sin embargo, la reactivación de telomerasa en células que no han llegado al estado de crisis evita alcanzar la inestabili-

dad genómica mediada por el acortamiento telomérico (revisado por Verdun y Karlseder, 2007), (**Figura 1.11**).

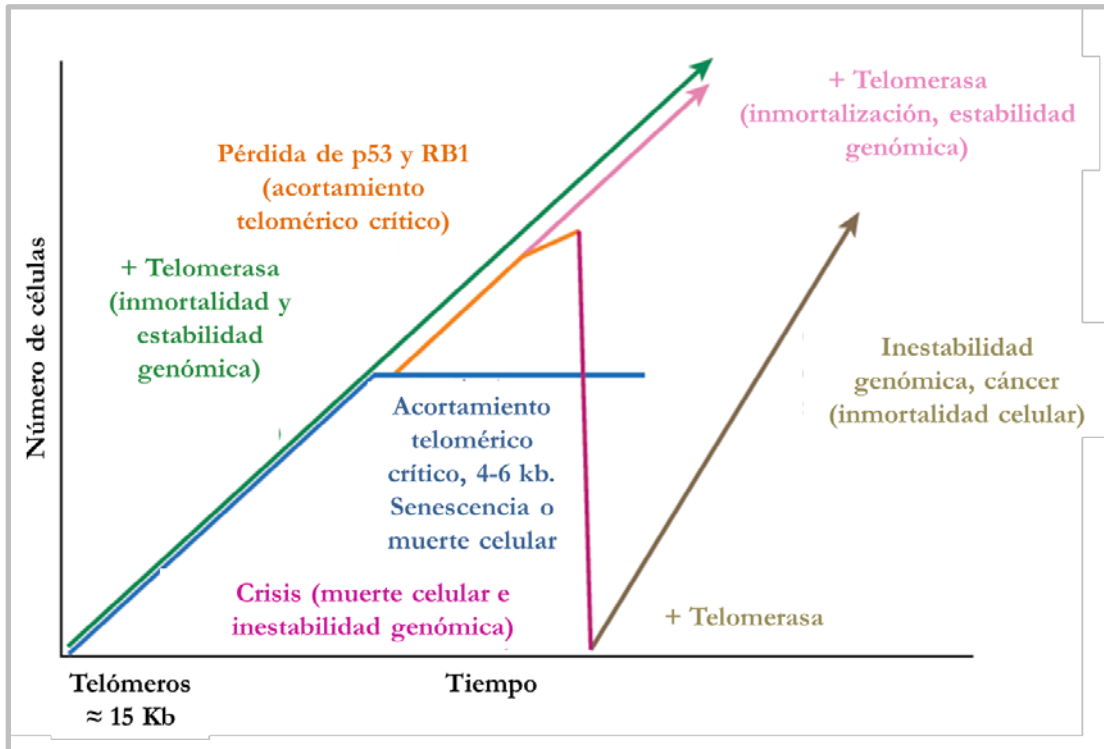


Figura 1.11. Acortamiento telomérico, muerte celular, senescencia y cáncer. Las células se dividen de manera exponencial, y los telómeros se acortan desde una longitud media de 15 Kb hasta alcanzar una longitud crítica, en torno a 4-6 Kb. Entonces se produce la parada del ciclo celular o la muerte de la célula (**azul**). La activación de telomerasa antes de este evento permite a las células dividirse de manera indefinida y mantener la estabilidad genómica (**verde**). Si las rutas de p53 y RB están afectadas, las células continúan dividiéndose (**naranja**) hasta perder por completo la protección telomérica, alcanzándose la fase de crisis, muerte celular e inestabilidad genómica masiva (**rosa oscuro**). Si la telomerasa es reactivada antes de que la erosión telomérica sea completa, las células son rescatadas de la inestabilidad genómica (**rosa claro**). Sin embargo, la reactivación de telomerasa tras la acumulación de mutaciones, agudiza la inestabilidad genómica, permitiendo que algunos clones portadores de múltiples mutaciones escapen de la muerte celular. Estas células están predispuestas a la transformación oncogénica (**marrón**). Adaptado de Verdun y Karlseder, 2007.

El acortamiento telomérico no sólo se produce como consecuencia de la replicación celular. El ambiente celular también juega un importante papel regulando la longitud telomérica y la actividad telomerasa. El estrés oxidativo puede causar acortamiento telomérico y los antioxidantes pueden decelerarlo (Zglinicki *et al.*, 1995 y Zglinicki, 2002). El estrés psicológico está asociado de manera significativa con mayores niveles de estrés oxidativo, menor actividad telomerasa y menor longitud telomérica, como se evidenció en las células mononucleares de sangre periférica de madres sanas de niños crónicamente enfermos, premenopáusicas, *vs.* madres sanas de niños sanos, premenopáusicas (Epel *et al.*, 2004). El diagnóstico y tratamiento del cáncer deriva en muchos pacientes en una respuesta de estrés crónico. El estudio presentado por el Doctor Edward Nelson, jefe de la Unidad de Hematología/Oncología de la Universidad de California, Irvine, en la 102 Conferencia anual de la Asociación Americana para la Investigación del Cáncer (AACR, American Association for Cancer Research, AACR) en Orlando, Florida, revela la importancia del apoyo psicológico a mujeres con cáncer de cuello uterino para tratar el estrés y modular la longitud telomérica (<http://www.aacr.org/home/public--media/aacr-in-the-news.aspx?d=2341>).

1.4.4. Otras funciones de los telómeros. La cromatina telomérica y la transcripción telomérica.

Los telómeros constituyen las agujas del reloj que cuenta las divisiones celulares e impone un límite superior (Greaves, 2002). **Los telómeros desempeñan diversas funciones**, entre las que se incluyen: la protección de los cromosomas ante procesos de degradación, fusión y recombinación, que amenazarían a su integridad (Griffith *et al.*, 1999a); participan en la organización de la arquitectura nuclear y desempeñan un papel importante en la segregación cromosómica durante la mitosis y meiosis (Kirk *et al.*, 1997). También están implicados en el apareamiento de cromosomas homólogos en la profase meiótica (Scherthan *et al.*, 1996) y presentan puntos de anclaje con la matriz nuclear, responsables de la organización nuclear durante la interfase (Ludérus *et al.*, 1996).

La **cromatina telomérica** presenta marcas epigenéticas que son características de la heterocromatina constitutiva¹² (Brown, 2008), como la trimetilación de histonas y

¹² La heterocromatina constitutiva es una característica permanente de todas las células y representa ADN que no contiene genes, por lo que siempre puede mantenerse en una organización compacta. Esta fracción comprende al ADN centromérico y telomérico, así como a ciertas regiones de otros cromosomas, como por ejemplo, la mayor parte del cromosoma humano Y.

la hipermetilación del ADN (revisado por Blasco, 2007). Esto indica que existe un nivel superior para controlar la longitud y estructura telomérica. Las diferentes modificaciones epigenéticas a nivel telomérico contribuyen a mantener la cromatina en un estado “cerrado” o “silenciado”, que permite regular el acceso de telomerasa, o de otros mecanismos de elongación telomérica, a los telómeros. Los cambios en las marcas epigenéticas van acompañados de una elongación anormal de los telómeros y una unión incrementada de factores de unión a las repeticiones teloméricas, como TRF1 (revisado por Blasco, 2005). La organización específica de la cromatina telomérica afecta también al denominado **Efecto de posición telomérico (TPE, *telomere position effect*)**, (Koering *et al.*, 2002). Este concepto hace alusión al control transcripcional de genes localizados cerca de los telómeros. Así, el ensayo *in vitro* de Catherine Elaine Koering y cols., puso de manifiesto que la expresión *del gen reportero EGFP*, localizado cerca del telómero, aumentaba tras un primer tratamiento con una dosis subtóxica de Tricostatina A, inhibidor de la histona deacetilasa (Koering *et al.*, 2002). Por último, resulta interesante mencionar que el efecto de posición telomérico puede estar implicado en la regulación del gen *hTERT*, con una particular localización cromosómica, en el extremo más distal del cromosoma 5 (Leem *et al.*, 2002; Shay y Wright, 2000 y Bryce *et al.*, 2000). Es posible que este efecto esté implicado en el control de la longitud telomérica en la línea germinal humana, donde hay actividad telomerasa, para asegurar que no tenga lugar un *súper alargamiento* telomérico. La subunidad catalítica de la telomerasa de ratón tiene una localización cromosómica interna; los ratones presentan telómeros de una longitud superior a los de los humanos, es posible que esto refleje la pérdida del efecto de posición telomérica en ratones sobre el gen *mTERT*, con una localización interna en el cromosoma 13 (Shay y Wright, 2000 y Greenberg *et al.*, 1998).

Los telómeros han sido considerados estructuras transcripcionalmente silentes. Sin embargo, **los telómeros se transcriben** en una variedad de moléculas de ARN, no codificantes (ncRNA, *non-coding RNA*) que constituyen el transcriptoma telomérico. Entre estos, el denominado TERRA (*telomeric repeat –containing RNA*) o TelRNA, fue el primero que se describió en células de mamíferos y posteriormente en otros organismos (pez cebra, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*), (Bah *et al.*, 2012; Arora *et al.*, 2011; Azzalin *et al.*, 2007; Luke *et al.*, 2008; Vrbsky *et al.*, 2010; Schoeftner y Blasco, 2008 y Greenwood y Cooper, 2012). Las moléculas de TERRA se transcriben a partir de las regiones inmediatamente precedentes a los telómeros, hacia el extremo de los cromosomas, principalmente es la ARN polimerasa II ADN dependiente (RNAPII) la que desarrolla este proceso, empleando como molde la hebra enriquecida en citosinas. TERRA permanece asociado a los telómeros tras la transcripción, sugiriendo que TERRA es un elemento que

forma parte de la heterocromatina telomérica (Bah *et al.*, 2012; Azzalin *et al.*, 2007; Luke *et al.*, 2008 y Schoeftner y Blasco, 2008). Los promotores que orquestan la transcripción de TERRA se han identificado en regiones subteloméricas, enriquecidas en islas CpG, de células humanas (de Farnung *et al.*, 2010 y Nergadze *et al.*, 2009). La metilación de citosinas del promotor de TERRA, mediada por las ADN metiltransferasas (DNMT) 1 y 3b, se relaciona negativamente con la unión de RNAPII al promotor de TERRA y con los niveles de TERRA, sugiriendo que la metilación de citosinas reprime la actividad transcripcional del promotor de TERRA (Nergadze *et al.*, 2009). TERRA/TelRNA parece estar implicado en la regulación negativa de la actividad telomerasa: sus niveles son prácticamente indetectables en embriones de ratón (entre los días 11.5 y 15.5 de gestación), etapa en la que es requerida una actividad telomerasa suficiente para el mantenimiento de las secuencias teloméricas ante la rápida división celular; se acumula en tejidos adultos que, mayoritariamente, han perdido la actividad telomerasa y los bajos niveles que presenta en muestras de cáncer humano podrían reflejar un mecanismo que asegure el óptimo mantenimiento telomérico por telomerasa, mientras las células proliferan indefinidamente en el proceso tumoral (Schoeftner y Blasco, 2008). Incluso se han propuesto distintos modelos para explicar el secuestro de TERRA por telomerasa (Redon *et al.*, 2010); pero el reciente hallazgo del Doctor Claus Azzalin y cols. desafía este aserto, mostrando que en las células de carcinoma colorrectal HCT116, carentes de las metiltransferasas DNMT1 y DNMT3b, con la eliminación completa del patrón de metilación de TERRA y niveles de TERRA aumentados, la enzima telomerasa es capaz de elongar los telómeros con total normalidad (Farnung *et al.*, 2012).

1.5. Mecanismos de mantenimiento telomérico.

1.5.1. La telomerasa. Estructura y regulación de telomerasa.

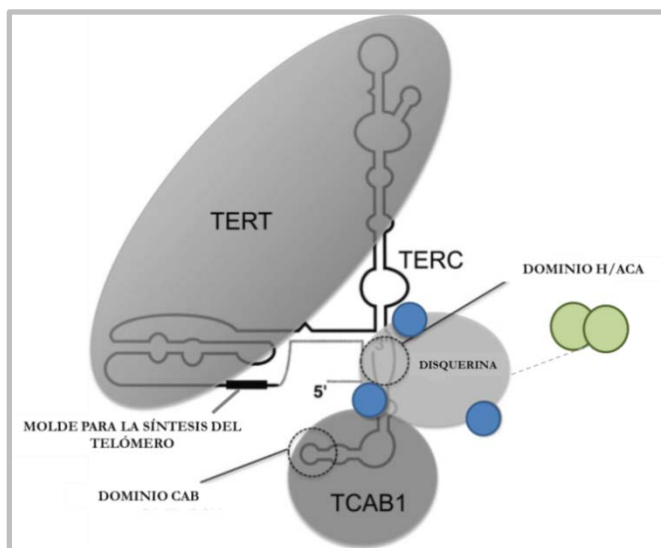
En el año 1985, las Doctoras Carol Greider y Elizabeth Blackburn mostraron la existencia de una particular actividad enzimática identificada en extractos nucleares de *Tetrahymena*, capaz de elongar una secuencia sintética de un oligonucleótido telomérico (TTGGGG)₄ (Greider y Blackburn, 1985). La denominaron “transferasa terminal del telómero”, abreviado como “**telomerasa**”¹³.

En humanos, la ribonucleoproteína telomerasa está compuesta por la subunidad catalítica hTERT, (*telomerase reverse transcriptase*, componente enzimático con actividad transcriptasa reversa) y el componente ARN, hTER (*human telomerase RNA*), y una serie de proteínas específicas accesorias (revisado por Wyatt *et al.*, 2010).

El **componente ARN de telomerasa, TER**, transcrito por la ARN polimerasa II, (revisado por Gallardo y Chartrand, 2008) incluye en el extremo 5' la secuencia molde para la adición de repeticiones teloméricas al extremo cromosómico, en aquellas células en las que hay actividad telomerasa. En el extremo 3' incluye la estructura secundaria H/ACA, que constituye el sitio de unión de la proteína disquerina (revisado por Artandi y DePinho, 2010). La disquerina es una proteína nucleolar, codificada por el gen *DKC1*, alterado en la disqueratosis congénita (Mason *et al.*, 2005 y Kirwan y Dokal, 2008) ; y está asociada con la telomerasa activada, como se ha verificado en los extractos celulares de cáncer humano. La disquerina es una proteína crítica para el ensamblaje de telomerasa y para la estabilidad de TERC, y está asociada a las ribonucleoproteínas NHP2, NOP10 y GAR1 (revisado por Artandi y DePinho, 2010). El heterotrímero integrado por disquerina, NHP2 y NOP10 es necesario para la estabilización y acumulación de hTER *in vivo* (Fu y Collins, 2007), la proteína GAR1 se une al dominio H/ACA para producir una ribonucleoproteína biológicamente funcional (Darzacq *et al.*, 2006). Las ATPasas pontina y reptina interaccionan con disquerina, y son requeridas para la estabilidad de disquerina y hTER *in vivo* (Venteicher *et al.*, 2008).

¹³ En el año 2009, fueron galardonadas, junto con Jack W. Szostak, con el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por el descubrimiento de cómo los cromosomas están protegidos por los telómeros y el descubrimiento de la enzima telomerasa.
(http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/).

El componente ARN de telomerasa presenta también un dominio CAB, *Cajal body*, región de unión de la proteína TCAB1, *telomerase Cajal body protein 1*, (revisado por Artandi y DePinho, 2010), (**Figura 1.12**). Los cuerpos de Cajal son estructuras subnucleares dinámicas, implicadas en distintos procesos, entre los que se incluyen la modificación y el ensamblaje de los snRNAs (*small nuclear RNAs*, ARNs nucleares pequeños), la maduración de las ribonucleoproteínas del espliceosoma y la maduración de los ARN mensajeros de las histonas (Deryusheva y Gall, 2009; Mahmoudi *et al.*, 2010 y Nizami *et al.*, 2010). Los cuerpos de Cajal acumulan telomerasa y se asocian transitoriamente con los telómeros (Jády *et al.*, 2006 y Zhu *et al.*, 2004). En concreto, durante la fase S del ciclo celular, una fracción de los cuerpos de Cajal colocaliza con los telómeros o con la telomerasa (Jády *et al.*, 2006 y Li *et al.*, 2010). La acumulación de telomerasa en los cuerpos de Cajal está mediada por la proteína WDR79, que también se ocupa del transporte de telomerasa a los telómeros. Por esta actividad fue renombrada como TCAB1, *telomerase Cajal body protein 1* (Tycowski *et al.*, 2009 y Venteicher *et al.*, 2009). En ratones, el componente ARN de telomerasa, mTER, no se acumula en los cuerpos de Cajal. El dominio CAB en mTER es idéntico al de humanos, pero hTER expresado de manera exógena en células de ratón sí se acumula en los cuerpos de Cajal; y ambos, hTER y mTER, son capaces de localizarse en los telómeros (Tomlinson *et al.*, 2010); sugiriendo que, quizás, los cuerpos de Cajal no son esenciales para el reclutamiento de telomerasa a los telómeros. Y así lo ha demostrado el trabajo reciente del Doctor J. Lewis Stern y cols.: la proteína TCAB1 es



capaz de acompañar a la telomerasa a los telómeros, por un mecanismo independiente a los cuerpos de Cajal. Los cuerpos de Cajal serían responsables de concentrar cantidades limitantes de telomerasa en una región del nucleoplasma, y en situaciones de sobre-expresión de telomerasa, TCAB1 es capaz de reclutarla a nivel telomérico (Stern *et al.*, 2012).

Figura 1.12. Representación esquemática de telomerasa. Las esferas azules representan a las proteínas asociadas a telomerasa, NHP2, NOP10 y GAR1. Las esferas verdes representan a las ATPasas reptina y pontina. TERT, componente enzimático y TERC, componente ARN de telomerasa. Adaptado de Artandi y DePinho, 2010.

El **componente enzimático de telomerasa, TERT**, y la actividad catalítica, están suprimidos en los tejidos somáticos humanos. En las células de la línea germinal y tumorales, la expresión y la actividad enzimática están elevadas. Análisis más precisos de muestras humanas han evidenciado que existen niveles moderados de actividad telomerasa en tejidos proliferativos con una tasa de renovación elevada, como la médula ósea, la piel, el tracto gastrointestinal y los testículos, así como en linfocitos activados. En estos tejidos con una alta tasa de renovación, la telomerasa es más activa en los compartimentos celulares donde residen las células *stem*/progenitoras (revisado por Artandi y DePinho, 2010). Numerosos estudios han demostrado que la expresión de hTERT es altamente específica en las células tumorales y está estrechamente relacionada con la actividad telomerasa, mientras que las otras subunidades de la telomerasa se expresan de manera constitutiva en las células normales y tumorales. En células tumorales, la actividad transcripcional del gen de *hTERT* está específicamente sobre-activada. Se han identificado numerosos **factores que regulan la expresión de *hTERT*** a nivel de su **promotor**. Entre ellos se pueden incluir: **factores celulares de transcripción**, como c-Myc, Sp1 y la proteína AP-2 (*Activating Enhancer-binding Protein-2*), activadores de la expresión de *hTERT*. En el promotor de *hTERT* también se han identificado sitios de unión para el factor-1 inducible por hipoxia, HIF-1, con resultados opuestos sobre la actividad transcripcional de *hTERT* según el tipo tumoral considerado. En el caso de HIF-2, los resultados también resultan contradictorios; provoca un aumento en la expresión de hTERT en el carcinoma de células renales, y actúa como represor en las células de glioma. AP-1 suprime la actividad telomerasa actuando como un represor transcripcional sobre el promotor de *hTERT* en células humanas, sin embargo, la telomerasa de ratón y *mTERT* no resultan afectados por AP-1. Las **hormonas** también ejercen un papel regulador sobre *hTERT*. Los estrógenos activan la transcripción de *hTERT*, los andrógenos también activan la transcripción del ARNm de *hTERT*, en células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos, pero su papel no es debido a la activación del promotor de *hTERT*. La progesterona ejerce efectos diversos sobre la expresión del ARNm de hTERT en células de cáncer de mama positivas para el receptor de progesterona, dependientes del tiempo de exposición a la hormona. En relación a las **citoquinas**, el factor de crecimiento epidérmico, EGF, *epidermal growth factor*, activa al promotor de *hTERT* y el TGF- β , *transforming growth factor beta*, actúa como un represor transcripcional de *hTERT*. Las **oncoproteínas** HER2/Neu, Ras y Raf facilitan la expresión de *hTERT*, a través de un miembro de la familia de factores de transcripción Ets en células no tumorales hTERT negativas. En cuanto a los **represores de *hTERT***, la proteína p53 es capaz de formar un complejo con Sp1, interrumpiendo la actividad transcripcional de Sp1 y provocando la represión sobre *hTERT*. La proteína WT1,

del tumor de Wilms, reprime la transcripción de *hTERT* en ciertos tipos celulares (revisado por Kyo *et al.*, 2008).

La **modulación epigenética del promotor de *hTERT*** ofrece una nueva herramienta para comprender su regulación. En el promotor de *hTERT* se localiza un grupo de islas CpG, suscitando la idea de que la metilación de las citosinas juega un importante papel en la regulación de *hTERT*; sin embargo, los resultados ofrecidos son contradictorios. Algunos grupos han demostrado que la metilación del promotor de *hTERT* causa el silenciamiento del gen, mientras otros no han hallado una correlación significativa entre la expresión de *hTERT* y la metilación de su promotor. Las histonas acetilasas (HATs, *histone acetylases*), y las histonas desacetilasas (HDACs, *histone deacetylases*) provocan la acetilación y desacetilación de la cromatina, respectivamente, y también desempeñan papeles esenciales en la regulación de la expresión de *hTERT*. Las histonas también están sujetas a procesos de metilación, implicados en la regulación de *hTERT* (revisado por Daniel *et al.*, 2012).

1.5.2. Telomerasa, más allá de los telómeros.

Además del consabido papel de telomerasa a nivel telomérico, desempeña otras acciones extra-teloméricas. El componente enzimático de telomerasa, TERT, está implicado en la reparación del ADN e induce la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento celular, como el factor de crecimiento epidérmico, EGFR, en células epiteliales mamarias (revisado por Bollmann, 2008). Las funciones de telomerasa no están limitadas exclusivamente al núcleo: la actividad de la telomerasa está estrictamente regulada, y esto implica el transporte entre distintos compartimentos celulares. El reciente trabajo del Doctor Chatchawan Singhapol y cols. ha puesto de manifiesto que TERT se transporta desde el núcleo a la mitocondria en situaciones de estrés oxidativo, en células tumorales. Han hallado una correlación significativa entre la localización nuclear de telomerasa y el daño elevado en el ADN, sin embargo, las células que excluyen a la telomerasa del núcleo no presentaban daño en el ADN, o este era leve. La localización mitocondrial de telomerasa protege al núcleo del daño en el ADN y de la apoptosis, en contraste, la localización nuclear de telomerasa se relaciona con una alta proporción de ADN dañado y apoptosis. El daño en el ADN puede estar originado por la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno, ROS, *reactive oxygen species*. El Doctor Chatchawan Singhapol y cols. han demostrado específicamente que la localización mitocondrial de telomerasa evita el daño en el ADN disminuyendo los niveles de especies reactivas de oxígeno mitocondriales (Singhapol *et al.*, 2013). Telomerasa desempeña también acciones anti-

apoptóticas independientes de su actividad catalítica (revisado por Bollmann, 2008) y es crucial para garantizar la función y el potencial replicativo de las células madre. En la revisión de los Doctores Luís E. Donate y María A. Blasco se detalla el modelo que relaciona la función telomérica en células madre adultas con el cáncer y el envejecimiento. Las células madre adultas residen en compartimentos tisulares específicos, denominados nichos, enriquecidos en células con telómeros largos. En organismos jóvenes o adultos, con una *reserva telomérica* suficiente, las células madre adultas repueblan los tejidos de manera eficiente y reparan las lesiones tisulares, si es necesario. En los organismos envejecidos, los telómeros de las células madre pueden estar excesivamente acortados, haciendo que la movilización de las células madre y su capacidad para reparar tejidos sea menos eficiente. Cuando los telómeros han alcanzado una longitud crítica, son reconocidos como puntos de ADN dañados impidiéndose la movilización de las células madre fuera de sus nichos. De esta manera se reduce la probabilidad de que células con alteraciones se movilicen a los tejidos, disminuyendo el riesgo de cáncer. La última consecuencia de esta restricción es el fallo orgánico como resultado de la degeneración tisular. Sin embargo, si telomerasa se reactiva, especialmente en un contexto de mutaciones en los genes supresores tumorales, las células alteradas pueden mobilizarse a los tejidos e iniciar un tumor (revisado por Donate y Blasco, 2011).

1.5.3. Telomerasa y patologías asociadas.

La pérdida de la estabilidad de telomerasa que limita la capacidad proliferativa de las células hematopoyéticas y epiteliales da lugar a un trastorno cutáneo degenerativo, caracterizado por la pigmentación reticulada de la piel, atrofia ungueal, leucoplasia e insuficiencia de la médula ósea, designado como **disqueratosis congénita** (Fitzpatrick, 2010). Hasta un total de 6 genes (*DKC1*, *TERT*, *TERC*, *NOLA2*, *NOLA3*, *TINF2*¹⁴) han sido identificados como responsables de esta patología (Mialou *et al.*, 2013). Otras enfermedades como la **anemia aplásica** (Rodak, 2004 y Vulliamy *et al.*, 2002), el **síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson** (Hoyeraal *et al.*, 1970; Hreidarsson *et al.*, 1988 y Knight *et al.*, 1999) y la **fibrosis pulmonar idiopática** (DeLeón, 2004¹⁵ y Armanios, 2012) se relacionan con mutaciones en la telomerasa.

¹⁴ *DKC1*, disqueratosis congénita 1, disquerina. *TERT*, telomerasa transcritasasa reversa. *TERC*, componente ARN de telomerasa. *NOLA2*, ribonucleoproteína NHP2. *NOLA3*, ribonucleoproteína NOP10. *TINF2*, factor nuclear 2 de interacción con TRF1, TIN2.

¹⁵ La anemia aplásica es un síndrome de insuficiencia de la médula ósea. El síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson es una forma severa de la disqueratosis congénita, y la fibrosis pulmonar idiopática es

1.5.4. Telomerasa en el contexto telomérico.

La actividad telomerasa contrarresta el acortamiento telomérico derivado del problema de la replicación terminal. En los tumores se ocupa de mantener *estable* la longitud telomérica con el fin de preservar la capacidad proliferativa de las células (revisado por Samassekou *et al.*, 2010). No obstante, los telómeros de las células tumorales presentan, en general, una longitud inferior a los de las células no tumorales, debido a la acusada historia replicativa de las células tumorales en ausencia de telomerasa (revisado por Blasco, 2005). Aunque inicialmente fue establecido que telomerasa elongaba preferencialmente los telómeros más cortos (Steinert *et al.*, 2000; Ouellette *et al.*, 2000 y Bianchi y Shore, 2008), en el trabajo del Doctor Yong Zhao y cols., con las líneas celulares HeLa y H1299¹⁶, se demuestra que telomerasa no es reclutada de manera preferente a los telómeros más cortos, sino que es capaz de actuar sobre todos los telómeros cuando sus longitudes son homogéneas (Zhao *et al.*, 2009).

El reclutamiento de la enzima a los telómeros humanos es un mecanismo complejo, y aún no ha sido completamente dilucidado, pero implica la asociación de la enzima con los cuerpos de Cajal y la interacción de telomerasa con TPP1 (revisado por Stewart *et al.*, 2012). En las células de cáncer humanas las hebras ricas en guanina de la mayoría de los extremos cromosómicos son ampliadas por telomerasa inmediatamente después de su replicación, que tiene lugar a lo largo de la fase S del ciclo celular. Sin embargo, la síntesis de la hebra rica en citosinas por la maquinaria convencional de replicación del ADN, sucede tardíamente en la etapa S/G2, por tanto ambos procesos acaecen de manera descoordinada (Zhao *et al.*, 2009). La reacción catalizada por telomerasa sucede cíclicamente, (**Figura 1.13**).

una enfermedad caracterizada por la presencia de una respuesta fibroproliferativa pulmonar difusa que conduce a una destrucción rápida del parénquima neumónico.

¹⁶ HeLa, células epiteliales humanas procedentes de un carcinoma de cuello uterino. H1299, células humanas procedentes de un carcinoma de pulmón de células no microcítico.

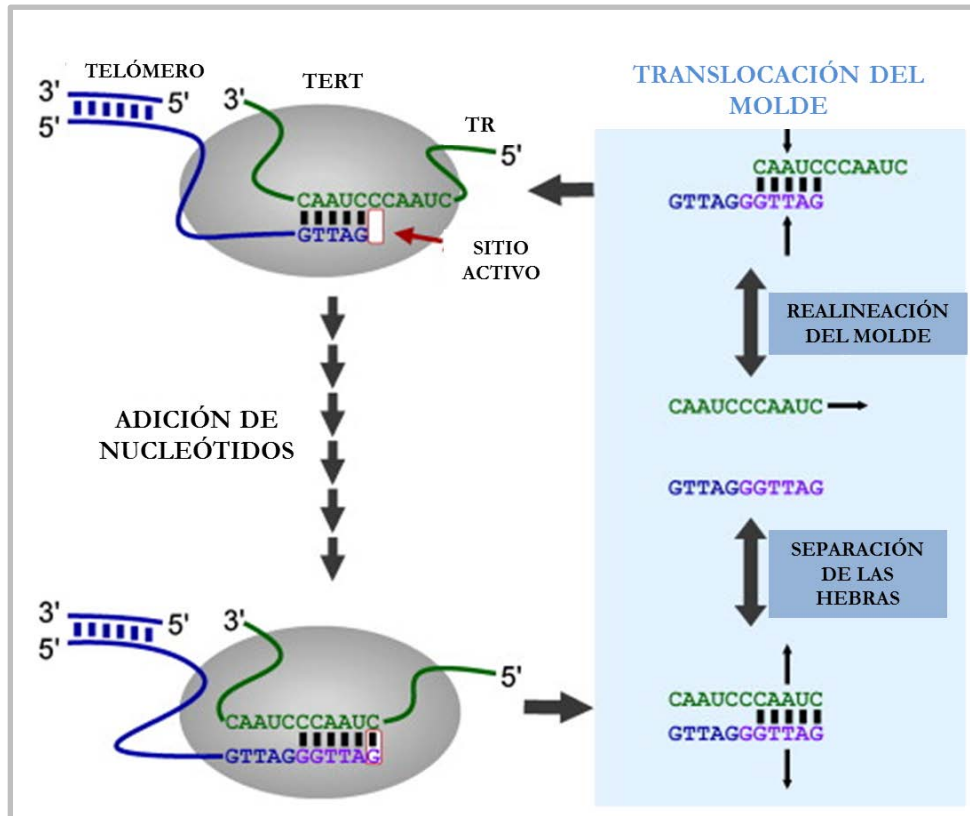
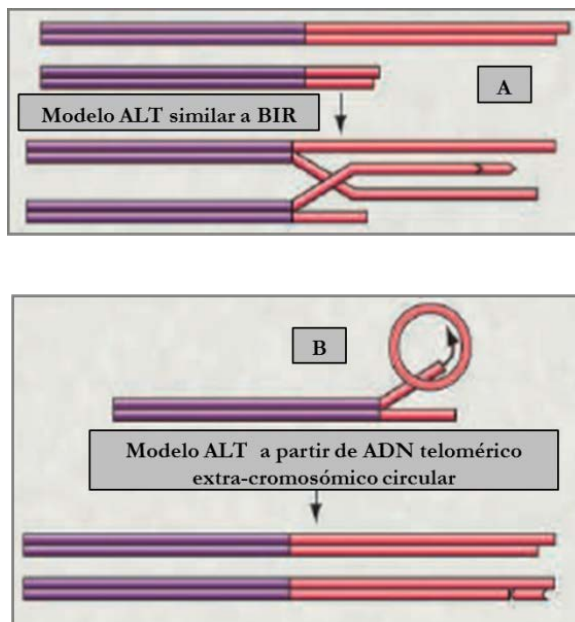


Figura 1.13. Actividad catalítica de telomerasa. La actividad catalítica de telomerasa puede dividirse en dos pasos: la adición de nucleótidos (izquierda), mecanismo común a todas las polimerasas y la translocación del molde de ARN (derecha, caja azul), propiedad única de la telomerasa. Tras el ensamblaje del núcleo catalítico de telomerasa, integrado por TERT (el componente enzimático, en gris) y TR (el componente ARN, en verde), con la secuencia de ADN telomérico, un total de seis nucleótidos se añaden secuencialmente (representados en color violeta). La secuencia telomérica es elongada mediante un proceso que comprende varios pasos, entre los que se incluyen la separación del híbrido ADN/ARN, la realineación del molde de ARN de telomerasa con la secuencia de ADN telomérico y la formación del nuevo híbrido ADN/ARN. Adaptado de Podlevsky y Chen, 2012.

1.5.5. La ALTERNativa a telomerasa.

La mayoría de los tumores (85-90%) recurren a la enzima telomerasa para garantizar su potencial replicativo ilimitado. Sin embargo, aproximadamente un 10% de los tumores humanos emplean un mecanismo alternativo para mantener sus telómeros. Es el conocido mecanismo **ALT**, *alternative lengthening of telomeres*. Tumores como los osteosarcomas, los sarcomas pleomórficos indiferenciados, los leiomiomas, los astrocitos¹⁷ de grado 2 y 3 y los tumores pancreáticos neuroendocrinos recurren a esta estrategia de mantenimiento telomérico. Las células que emplean los mecanismos ALT para mantener sus telómeros presentan algunas características particulares: longitudes teloméricas altamente heteróneas y abundante ADN telomérico extra-cromosómico. En los cánceres más frecuentes, los carcinomas, derivados del tejido epitelial, los mecanismos ALT son relativamente raros. Probablemente porque los tejidos epiteliales altamente proliferativos expresan niveles moderados de telomerasa, y así, durante el proceso oncogénico es más probable que estas células mantengan sus telómeros incrementando la expresión de la enzima (revisado por Verdun y Karlseder, 2007 y Shay *et al.*, 2012).

El mecanismo molecular para la síntesis alternativa de los telómeros, (**Figura 1.14**) aún no es bien conocido, pero podría asemejarse al modelo de reparación por re-



combinación homóloga conservativa, BIR, *break-induced replication*, según el cual el extremo de una hebra de ADN invade una secuencia homóloga e inicia la replicación del ADN, empleando la secuencia homóloga como molde. También se especula que sea el ADN telomérico extra-cromosómico, en forma circular, el que actúe como molde (revisado por Verdun y Karlseder, 2007 y Shay *et al.*, 2012).

Figura 1.14. Mecanismos alternativos para el mantenimiento telomérico. Adaptado de Shay *et al.*, 2012.

¹⁷ Los osteosarcomas, o sarcomas osteogénicos, son tumores que se inician en los huesos. El sarcoma pleomórfico indiferenciado, también conocido como *histiocitoma fibroso maligno* se encuentra con más frecuencia en los brazos o las piernas. Los leiomiomas son tumores malignos de los músculos lisos. Los astrocitos se inician en el cerebro o en la médula espinal. (<http://www.cancer.org>).

1.5.6. La terapia antitumoral basada en telomerasa.

Los telómeros y la telomerasa desempeñan papeles esenciales en el proceso tumoral, y constituyen dianas terapéuticas prometedoras en la terapia anticancerígena: la mayoría de las células tumorales humanas presentan telómeros, en general, de una longitud inferior a los de las células no tumorales y, en torno al 80-90% de los tumores humanos presentan actividad telomerasa (revisado por Shay y Wright, 2010; Deng y Chang, 2007 y Martínez y Blasco, 2011).

Existen varias terapias dirigidas a telomerasa en fase de ensayo clínico, que son efectivas en el ámbito preclínico. Entre ellas se incluyen: el inhibidor de la actividad enzimática imetelstat (en tumores no microcíticos de pulmón, mieloma múltiple y cáncer de mama; fase 2); la inmunoterapia dirigida a epítomos de telomerasa expresados sólo en células tumorales (cáncer de páncreas; fase 3) y la viroterapia, que implica el uso del promotor de *hTERT* como regulador de genes adenovirales y que sólo elimina a las células positivas para telomerasa (revisado por Ouellette *et al.*, 2011). Los mecanismos ALT para el mantenimiento de las secuencias teloméricas no deben ser desdeñados cuando se contemplan las terapias antitelomerasa: los tumores que emplean esta alternativa para elongar los telómeros no responden a estas terapias, y los tumores que expresan telomerasa podrían volverse resistentes recurriendo a los mecanismos ALT, como se ha demostrado en el trabajo del Doctor Jian Hu y cols., en ratones (Hu *et al.*, 2012). Además, algunos tumores podrían emplear ambos mecanismos para mantener sus telómeros, y se desconoce si ambos mecanismos podrían activarse de manera simultánea en las mismas células. Por tanto, aunque ALT sea un mecanismo minoritario debe ser considerado, y las terapias que combinen inhibidores frente a ambas estrategias de mantenimiento telomérico deberían ser, en consecuencia, más exitosas y duraderas (revisado por Shay *et al.*, 2012).

1.6. Función telomérica. Senescencia replicativa, muerte celular y cáncer.

Las células somáticas poseen un potencial replicativo limitado. Los trabajos de Hayflick y Moorhead, con células fetales humanas, a comienzos de la década de los 60, fueron pioneros en el establecimiento de este concepto: las células primarias aisladas a partir de tejidos y crecidas en cultivo poseían una capacidad replicativa finita. Un vez que alcanzan su límite replicativo, límite de Hayflick, las células permanecen en un estado *senescente* (Hayflick, 1965 y Hayflick y Moorhead, 1961). El concepto de **senescencia replicativa** está limitado a aquellas células mitóticamente competentes y que han experimentado una parada del ciclo celular como consecuencia del **acortamiento telomérico** (Muller, 2009). Los telómeros disfuncionales¹⁸, es decir, los que no son capaces de ejercer sus funciones protectoras, son reconocidos como roturas en la doble hebra que impactan directamente sobre las rutas supresoras de tumores mediadas por p53 y/o RB, retinoblastoma, para inducir la expresión de las proteínas p21 (proteína codificada por *CDKN1A*, inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A) e *INK4A* (también designada como p16 y codificada por *CDKN2A*, inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A). Los telómeros disfuncionales provocan la activación de las quinasas ATM o ATR. Una vez activadas, estas quinasas fosforilan factores situados en puntos inferiores de su cascada de señalización, entre los que se incluyen CHK1 (*checkpoint kinase 1*) y CHK2 (*checkpoint kinase 2*), que a su vez fosforilan a p53. La fosforilación de p53 origina el desplazamiento de la proteína MDM2 (*murine double minute 2*), regulador negativo de p53, liberándolo de la degradación, y estimulando la expresión del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21, diana transcripcional de p53. p21 inhibe la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de las quinasas dependiente de ciclinas. La inhibición de las quinasas dependientes de ciclinas permite el mantenimiento de la forma hipofosforilada de retinoblastoma, que retiene al factor E2F, impidiendo la progresión del ciclo celular (revisado por Stengel *et al.*, 2009 y Deng *et al.*, 2008). Además de limitar la progresión del ciclo celular, e inducir la entrada en senescencia, los telómeros disfuncionales pueden promover la apoptosis dependiente de p53. Por tanto, en un contexto celular con p53 competente, los telómeros disfuncionales actuarían como potentes supresores tumorales, desencadenando la puesta en marcha de las rutas celulares que conducen a la senescencia replicativa y/o a la apoptosis para inhibir la formación tumoral. La pérdida de p53 puede crear un ambiente celular permisivo que favorezca la proliferación y la supervivencia de células genéticamente dañadas, y en último término la

¹⁸ Los telómeros disfuncionales pueden originarse por un acortamiento progresivo o por la alteración de los componentes del complejo *shelterin*.

progresión del cáncer (revisado por Deng *et al.*, 2008). La implicación de la vía INK4A-RB en respuesta a la disfunción telomérica es menos clara. El trabajo de las Doctoras Jacqueline J.L. Jacobs y Titia de Lange sitúa también a p16 como un segundo efector de la vía de respuesta al telómero disfuncional: mediante el sistema de inducción experimental de daño telomérico a través de la inhibición de la proteína telomérica TRF2, se evidenció que el daño en el telómero puede también originar una parada del ciclo celular (G1/S) a través del regulador de RB, p16^{INK4a}, especialmente en células que pierden la función de p53: p16^{INK4a} puede responder al daño en el telómero y contribuir a la entrada en senescencia originada por los telómeros, en células que pierden la función normal de p53 (Jacobs y de Lange, 2005), (**Figura 1.15**).

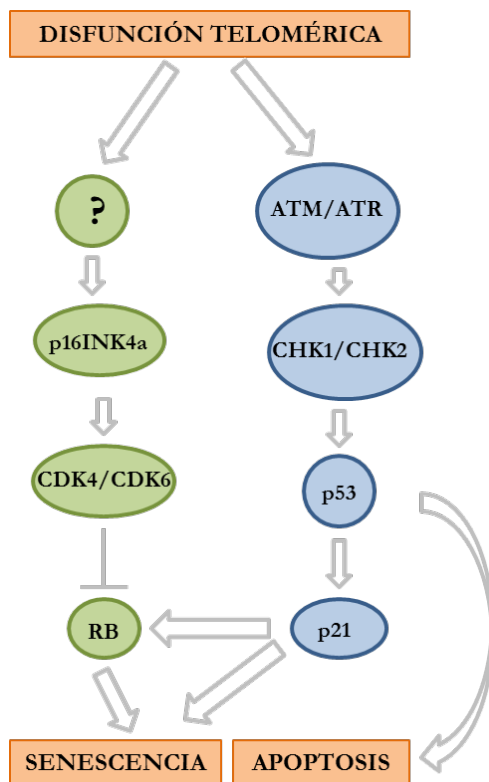


Figura 1.15. La disfunción telomérica pone en marcha las rutas de p53 y RB. El acortamiento progresivo de los telómeros, o la alteración del complejo *shelterin*, resulta en la activación de las quinasas ATM/ATR, que activan a las quinasas CHK1/CHK2, conduciendo finalmente a la activación de p53. p53 inhibe la tumorigénesis promoviendo la activación transcripcional de genes, que conducen a la entrada en senescencia o a la apoptosis. La fosforilación de RB está regulada por pequeñas moléculas inhibidoras, denominadas CKIs (inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas, CDK), las cuales se unen a las CDKs o a los complejos ciclina/CDKs e inhiben la actividad quinasa de los complejos de ciclina/CDK. Entre las CKIs se incluyen p21 y p16 (Ko *et al.*, 2009). Adaptado de Pang y Argyle, 2009.

Si los puntos de control de proliferación impuestos por p53 y retinoblastoma, en respuesta al acortamiento telomérico fracasan, los telómeros continúan acortándose. Las células se ven abocadas a la entrada en la fase de crisis, un segundo punto de control de la proliferación, caracterizado por la muerte celular masiva y la inestabilidad genómica. Algunas células son capaces de escapar de la crisis mediante la activa-

ción de mecanismos de mantenimiento telomérico, telomerasa o ALT, para alcanzar la inmortalidad (revisado por Samassekou *et al.*, 2010 y Deng *et al.*, 2008), (**Figura 1.16**).

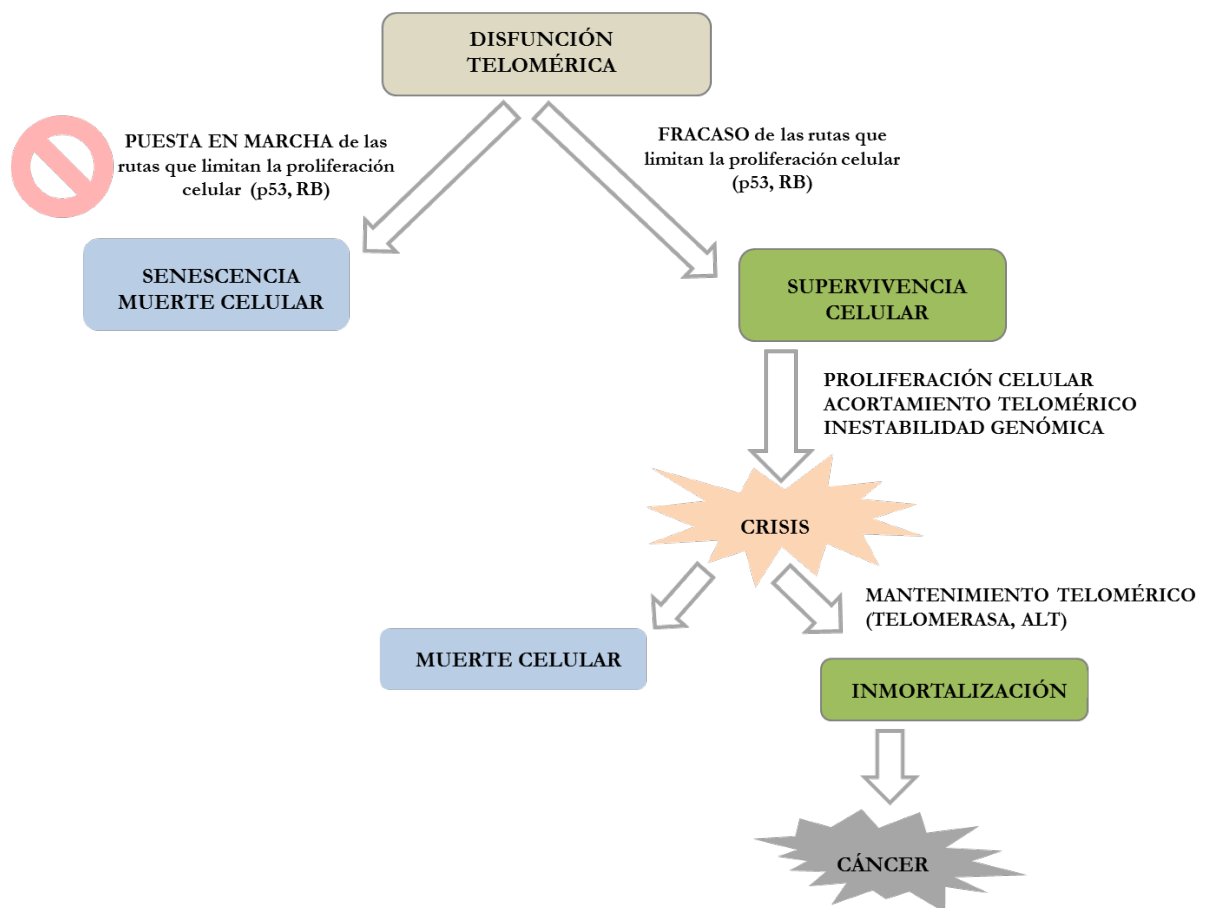


Figura 1.16. Respuestas celulares a la disfunción telomérica.
Adaptado de Callén y Surrallés, 2004.

El concepto de senescencia replicativa se ha equiparado tradicionalmente a los términos de senescencia celular y envejecimiento celular, y erróneamente se asume su equivalencia con la parada del ciclo celular. La parada del ciclo celular es una de las características del fenotipo senescente, que incluye otras, tales como: una respuesta alterada a los estímulos apoptóticos, una expresión génica alterada, cambios morfológicos y la posibilidad de determinar la actividad β -galactosidasa como biomarcador de

senescencia. Así pues, las células senescentes se encuentran *activamente paradas* (revisado por Blagosklonny, 2011 y Muller, 2009).

La apoptosis desempeña un claro papel como supresor tumoral *in vivo*, y en cuanto a la senescencia existen también evidencias al respecto (revisado por Deng *et al.*, 2008). En el trabajo de los Doctores David M. Feldser y Carol W. Greider, empleando el modelo de ratón transgénico para el linfoma de Burkitt, se constata el papel del acortamiento telomérico como limitador de la progresión tumoral mediante la inducción de senescencia. En este contexto, el acortamiento telomérico es capaz de inducir la entrada en senescencia mediada por p53, para limitar la formación del tumor *in vivo*, aún cuando se bloquea la apoptosis (Feldser y Greider, 2007). Los programas de supresión tumoral, la apoptosis y la senescencia, inducidos por p53 dependen del contexto celular: la restauración de la función de p53 en tumores carentes de ella induce apoptosis en linfomas (Martins *et al.*, 2006 y Ventura *et al.*, 2007) y senescencia en sarcomas (Ventura *et al.*, 2007) y en carcinomas hepáticos (Xue *et al.*, 2007).

El conocimiento de los mecanismos moleculares que limitan el crecimiento neoplásico es clave a la hora de considerar las terapias antitumorales. El éxito de las terapias antitelomerasa requiere de la funcionalidad de p53 para limitar la progresión tumoral en respuesta a la disfunción telomérica. Por tanto, estas terapias podrían combinarse con otras que restauren la función de p53, o que actúen sobre factores situados en puntos inferiores en la cascada de señalización de p53 (revisado por Yang *et al.*, 2009 y Feldser y Greider, 2007).

Por último, es importante considerar que las células senescentes son capaces de secretar factores al medio promoviendo la transformación maligna de las células vecinas (Krtolica *et al.*, 2001) y que además, algunos agentes quimioterapéuticos son capaces de inducir una parada del ciclo celular prolongada e independiente del estatus telomérico denominada *senescencia celular acelerada* (ACS, *accelerated cellular senescence*). Algunas células tumorales en este estado pueden eludir la parada del ciclo celular, y volver a proliferar causando la progresión tumoral, (Wu *et al.*, 2012). Conocer y manejar adecuadamente estos procesos contribuirá al éxito de las terapias anticancerígenas.

2. Material y Métodos

2.1. Pacientes y muestras tisulares.

Para la realización del presente trabajo se dispuso de las muestras suministradas por el Biobanco del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Se emplearon un total de 120 muestras de tejido colorrectal, procedentes de 60 pacientes afectados de cáncer colorrectal (CCR) y 136 muestras de tejido pulmonar, provenientes de 68 pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP). Todas las muestras se obtuvieron de pacientes afectados de los cánceres antes citados e intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo y Servicio de Cirugía Torácica, del citado Hospital. El periodo de seguimiento de ambas series de pacientes fue de cinco años. En todos los casos se dispuso de muestras de tejido tumoral y no tumoral (tejido control) del mismo paciente, esta última tomada al menos a 10 cm de distancia del margen del tumor. Las muestras proporcionadas se presentaban incluidas en bloques de medio congelante (Jung Tissue Freezing Medium™ Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se almacenaron a -80° C hasta su uso.

Secciones de 5 micras de las muestras tumorales (realizadas en los criostatos cedidos por el Servicio de Inmunología y la Unidad de Investigación y Experimentación Animal del Hospital Clínico San Carlos de Madrid) fueron fijadas en un portaobjetos y examinadas por un anatomopatólogo del Servicio de Anatomía Patológica del mencionado Hospital. El examen se realizó por observación directa de las muestras teñidas con hematoxilina-eosina. Se excluyeron del estudio las muestras tumorales que reunían estas características: contener más de un 20% de tejido no tumoral y/o más de un 10% de necrosis, y/o presentar degradación en el ARN.

Los **adenocarcinomas colorrectales** se agruparon en cuatro estadios clínico-patológicos según la clasificación descrita por Turnbull y cols. en 1967 (Turnbull *et al.*, 1967), modificación de la original descrita por Dukes. Las características de los estadios se definen a continuación (**Tabla 2.1**).

| ESTADIO | CARACTERÍSTICAS |
|------------------|---|
| Estadio A | Tumor confinado al colon y a sus paredes. |
| Estadio B | Extensión del tumor a la grasa pericólica. |
| Estadio C | Metástasis tumorales a los ganglios linfáticos mesentéricos, pero sin evidencias de diseminación a distancia. |
| Estadio D | Metástasis tumorales a hígado, pulmón, hueso, diseminación del tumor. No operable debido a la invasión parietal; invasión a los órganos adyacentes. |

Tabla 2.1. Clasificación de Turnbull y cols. para los tumores de colon.

También se clasificaron de acuerdo a su localización anatómica, en el colon derecho, izquierdo o recto (**Figura 2.1**).

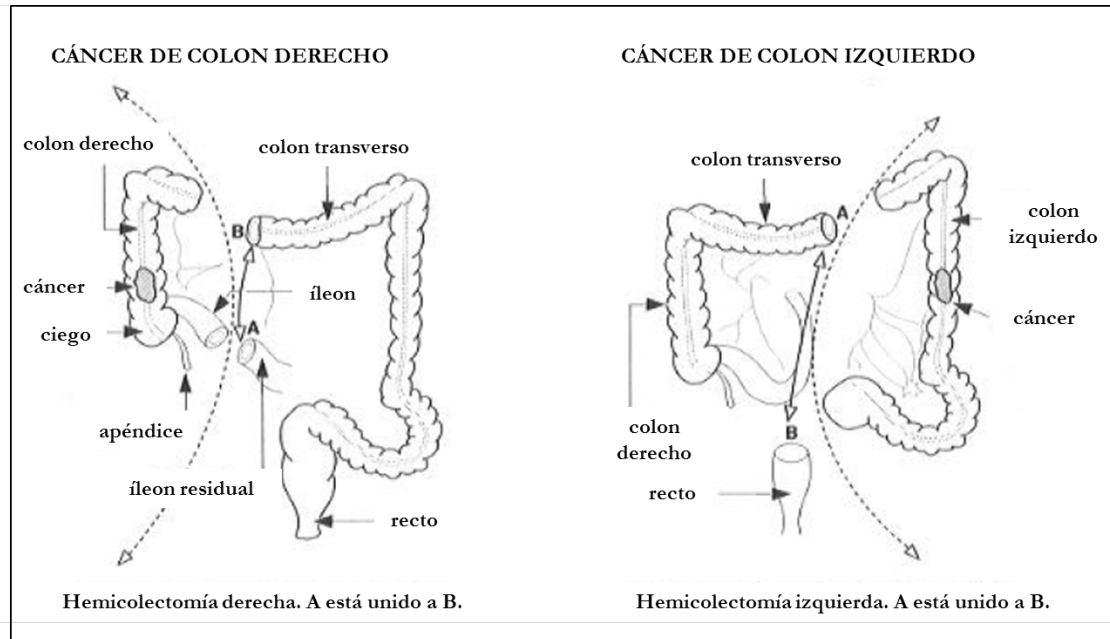


Figura 2.1. Hemicolectomías derecha e izquierda.
Adaptado de Escudero, 2004.

Finalmente, se dispuso también de la información correspondiente a los descriptores T, N y M del sistema de clasificación TNM: tumor primario (*primary tumor T*), grado de invasión a los ganglios linfáticos (*nodal involvement N*) y presencia o ausencia de metástasis (*distant metastasis M*), originalmente propuesto por Denoix (Denoix, 1946). Este sistema proporciona una descripción consistente y reproducible de la extensión anatómica del cáncer en un momento concreto de la enfermedad. Se muestran a continuación, en la siguiente tabla (**Tabla 2.2**), las características de los descriptores T, N y M para el cáncer colorrectal (<http://www.cancer.gov/>).

| | |
|-----|--|
| TX | No se puede evaluar el tumor primario. |
| T0 | No hay prueba de tumor primario. |
| Tis | Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia. |
| T1 | El tumor invade la submucosa. |
| T2 | El tumor invade la muscularis propia. |
| T3 | El tumor invade a través de la muscularis propia hacia los tejidos pericólicas rectales. |
| T4a | El tumor penetra la superficie del peritoneo visceral. |
| T4b | El tumor invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras. |

| | |
|-----|--|
| NX | No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales. |
| N0 | No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales. |
| N1 | Hay metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales. |
| N1a | Hay metástasis en un ganglio linfático regional. |
| N1b | Hay metástasis en 2 a 3 ganglios linfáticos regionales. |
| N1c | Hay depósito(s) tumoral(es) en la subserosa o en los tejidos mesentéricos o pericólicos no peritonealizados, o en los tejidos perirrectales, sin metástasis ganglionar regional. |
| N2 | Hay metástasis en ≥ 4 ganglios linfáticos regionales. |
| N2a | Hay metástasis en 4 a 6 ganglios linfáticos regionales. |
| N2b | Hay metástasis en ≥ 7 ganglios linfáticos regionales. |

| | |
|-----|---|
| M0 | No hay metástasis a distancia. |
| M1 | Hay metástasis a distancia. |
| M1a | La metástasis está confinada a un órgano o sitio (es decir, hígado, pulmón, ovario, ganglio no regional). |
| M1b | Hay metástasis en >1 órgano o sitio, o el peritoneo. |

Tabla 2.2. Características de los descriptores T, N y M para el cáncer colorrectal.

En la siguiente tabla se resumen las características clínico-patológicas de las muestras de cáncer colorrectal consideradas en este trabajo (**Tabla 2.3**).

| VARIABLE | | NÚMERO DE CASOS |
|---|-----------|-----------------|
| SEXO | | 60 |
| | Femenino | 32 |
| | Masculino | 28 |
| EDAD* | | 58 |
| | ≤ 72 años | 29 |
| | > 72 años | 29 |
| ESTADIO* | | 56 |
| | A | 11 |
| | B | 28 |
| | C | 10 |
| | D | 7 |
| T*, tumor primario | | 57 |
| | T1 | 2 |
| | T2 | 11 |
| | T3 | 37 |
| | T4 | 7 |
| N*, diseminación a los ganglios linfáticos | | 56 |
| | N0 | 41 |
| | N1 | 8 |
| | N2 | 7 |
| M*, metástasis | | 56 |
| | M0 | 40 |
| | M1 | 14 |
| LOCALIZACIÓN* | | 56 |
| | Derecho | 14 |
| | Izquierdo | 20 |
| | Recto | 22 |
| RECURRENCIA* | | 52 |
| | NO | 50 |
| | SÍ | 4 |

Tabla 2.3. Características clínico-patológicas de los carcinomas colorrectales.* Para la edad de los pacientes, el estadio, los descriptores T, N y M, la localización del tumor y la recurrencia en el proceso tumoral, no se dispuso de la información en 2, 4, 3, 4, 6, 4 y 6 casos, respectivamente.

Los **tumores de pulmón** sometidos a estudio en este trabajo pertenecen al grupo de los cánceres no microcíticos de pulmón (CNMPs). La clasificación histológica clásica de los CNMPs se ha empleado en este trabajo (adenocarcinomas, carcinomas epidermoides y carcinomas indiferenciados de célula grande).

Los tumores no microcíticos de pulmón se agruparon, además, de acuerdo a la clasificación TNM descrita por Mountain en 1997 (Mountain, 1997). Se detallan a continuación las características de los descriptores T, N y M para los tumores de pulmón (**Tabla 2.4**), (Mountain, 1986). En el año 2010, el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *Union Internationale Contre le Cancer* adoptaron el Sistema Internacional de Estadificación para el Cáncer de Pulmón Revisado, que incluye algunas modificaciones para los descriptores T y M (www.cancer.gov).

| DESCRIPTOR | CARACTERÍSTICAS |
|--|--|
| T, tumor primario | |
| T0 | No existen evidencias de tumor primario. |
| TX | El tumor primario no puede ser evaluado, o bien ha sido certificado por la presencia de células malignas en el esputo o lavado bronquial, pero no visualizado por imágenes o broncoscopia. |
| TIS | Carcinoma <i>in situ</i> . |
| T1 | Tumor < a 3 cm en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal al bronquio lobar. |
| T2 | Tumor > a 3 cm en su diámetro mayor, o un tumor de cualquier tamaño que invade la pleura visceral o está asociado a atelectasias o neumonitis obstructiva extendiéndose a la región hiliar. En la broncoscopia, la extensión proximal del tumor debe incluir al bronquio lobar o estar al menos a 2 cm de la carina. Las atelectasias o neumonitis obstructivas no deben afectar a todo el pulmón. |
| T3 | Tumor de cualquier tamaño que invade directamente la pared torácica, el diafragma, la pleura mediastinal o el pericardio, sin afectar al corazón, grandes vasos, la tráquea, el esófago o los cuerpos vertebrales. O un tumor en el bronquio principal a una distancia <2 cm de la carina, sin afectarla. |
| T4 | Tumor de cualquier tamaño con invasión al mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpos vertebrales o la carina, o con derrame pleural maligno. |
| N, invasión a los ganglios linfáticos | |
| N0 | No hay metástasis demostrables a los ganglios linfáticos regionales. |
| N1 | Metástasis a los ganglios linfáticos en la región hiliar peribronquial o ipsilateral, o ambas, incluyendo extensión directa del tumor. |
| N2 | Metástasis a los ganglios linfáticos ipsilaterales mediastinales y subcarinales. |
| N3 | Metástasis a los ganglios linfáticos contralaterales mediastinales, contralaterales hiliares, ipsilaterales, escalenos contralaterales o supraclaviculares. |
| M, metástasis | |
| M0 | Metástasis a distancia no conocidas. |
| M1 | Presencia de metástasis a distancia. |

Tabla 2.4. Características de los descriptores T, N y M para los tumores de pulmón.

En función a los descriptores T, N y M anteriores, se establecen los siguientes estadios tumorales (**Tabla 2.5**), (Mountain, 1997).

| ESTADIO | | CARACTERÍSTICAS |
|---------|-----|------------------------------|
| 0 | | <i>Carcinoma in situ</i> |
| I | IA | T1N0M0 |
| | IB | T2N0M0 |
| II | IIA | T1N1M0 |
| | IIB | T2N1M0 |
| | | T3N0M0 |
| IIIA | | T3N1M0 |
| | | T1N2M0 |
| | | T2N2M0 |
| | | T3N2M0 |
| IIIB | | T4N0M0 |
| | | T4N1M0 |
| | | T4N2M0 |
| | | T1N3M0 |
| | | T2N3M0 |
| | | T3N3M0 |
| | | T4N3M0 |
| IV | | Cualquier T y cualquier N M1 |

Tabla 2.5. Estadios TNM para el cáncer de pulmón.

Así pues, los tumores no microcíticos de pulmón se agruparon de acuerdo a la histología, los descriptores T, N, M y el estadio tumoral (**Tabla 2.6**).

| VARIABLE | | NÚMERO DE CASOS |
|--|--|-----------------|
| SEXO | | 68 |
| | Femenino | 10 |
| | Masculino | 58 |
| EDAD | | 68 |
| | ≤ 66 años | 33 |
| | > 66 años | 35 |
| ESTADIO | | 68 |
| | I | 49 |
| | II | 4 |
| | IIIA | 10 |
| | IIIB | 3 |
| | IV | 2 |
| T, tumor primario | | 68 |
| | T1 | 18 |
| | T2 | 40 |
| | T3 | 6 |
| | T4 | 4 |
| N, diseminación a los ganglios linfáticos | | 68 |
| | N0 | 55 |
| | N1 | 3 |
| | N2 | 9 |
| | N3 | 1 |
| M, metástasis | | 68 |
| | M0 | 66 |
| | M1 | 2 |
| TIPO HISTOLÓGICO* | | 67 |
| | Carcinoma epidermoide o de células escamosas | 34 |
| | Adenocarcinoma | 29 |
| | Carcinoma indiferenciado de célula grande | 4 |
| RECURRENCIA | | 68 |
| | NO | 45 |
| | SÍ | 23 |

Tabla 2.6. Características clínico-patológicas de los cánceres no microcíticos de pulmón. * Información no disponible para uno de los casos.

2.2. Extracción y valoración del ARN.

La extracción del ARN se realizó a partir de, aproximadamente, 12 cortes de tejido de 20 μm por muestra, almacenados en tubos estériles a -80°C . Los cortes se realizaron en los criostatos cedidos por el Servicio de Inmunología y la Unidad de Investigación y Experimentación animal del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

El protocolo se desarrolló siguiendo el método descrito por Chomczynski y Sacchi en 1987 (Chomczynski y Sacchi, 1987), ligeramente mejorado, empleando TRIzol[®] (Invitrogen, Carlsbad, California). Este reactivo es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que mantiene la integridad del ARN mientras se disgregan los cortes del tejido.

La homogeneización de los cortes del tejido en 1 ml de TRIzol[®] se logró con la ayuda de una pipeta automática, y posteriormente con una jeringuilla. Las muestras homogeneizadas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para lograr la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos. A continuación, se añadieron 200 μl de cloroformo a cada uno de los tubos y se agitaron vigorosamente con un agitador mecánico. La mezcla reposó durante 3 minutos a temperatura ambiente, y a continuación, se centrifugó a 13200 rpm, durante 15 minutos a 4°C . La centrifugación permitió la separación de la mezcla en una fase inferior rojiza (fase fenol-cloroformo), una inter-fase y una fase superior incolora (fase acuosa). El ARN permanece en esta última fase, que se transfiere a un nuevo tubo estéril. Para la precipitación del ARN, se adicionaron 500 μl de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó durante toda la noche a -20°C . Tras la precipitación, los tubos se centrifugaron a 13200 rpm, durante 15 min a 4°C . Se eliminó el sobrenadante, y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%, frío, centrifugando los tubos a 13200 rpm, durante 5 minutos a 4°C . Finalmente, tras la centrifugación, se retiró el etanol del lavado, el ARN se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 25 μl de agua libre de nucleasas.

La determinación de la concentración del ARN extraído se realizó mediante una lectura espectrofotométrica a 260 nm (A_{260}). Así, una unidad de densidad óptica a 260 nm se corresponde con una concentración de ARN o de ADN de cadena sencilla de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sambrook *et al.*, 1989). Se emplearon cubetas de cuarzo para la valoración de 2 μl de ARN diluido en 98 μl de agua libre de nucleasas, y como *blanco* se empleó agua libre de nucleasas. También se midió la absorbancia a 280 nm (A_{280}) para estimar la pureza del ARN: considerándose un grado de pureza óptimo si el cociente $A_{260}/A_{280} \geq 2$.

La integridad del ARN aislado se determinó mediante el desarrollo de una electroforesis, con el fin de visualizar las bandas de ARN ribosómico mayoritario: 28S (~5 Kb) y 18S (~2 Kb). Para ello, se preparó un gel de agarosa al 0.8% con TBE 1X (TBE 10X: Tris 1 M, ácido bórico 0.9 M y EDTA 0.01 M), al que se le añadió bromuro de etidio (1 mg/ml) para poder visualizar las bandas. Cada pocillo del gel se cargó con 1 µg de ARN, tampón de carga 1X (tampón de carga 6X: 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xileno cianol y 30% de glicerol) y agua libre de nucleasas.

Las muestras se almacenaron a -80° C hasta su uso.

2.3. Extracción y valoración del ADN.

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Blin y Stafford (Blin y Stafford, 1976), con modificaciones. Se realizó a partir de pequeños fragmentos de tejido, seccionados con cuchillas estériles, de los bloques embebidos en medio congelante (Jung Tissue Freezing Medium™, Leica Microsystems).

Los fragmentos correspondientes a cada una de las muestras se introdujeron en un tubo estéril de 50 ml que contenía 2.5 ml de Solución tampón 1 (**Tabla 2.7**). A continuación, se llevó a cabo la homogeneización del tejido. El vástago empleado se mantuvo la noche anterior en NaOH 4N, y se aclaró con agua ultra pura estéril, tanto al inicio como entre cada uso. Después, se añadieron 100 µl de una solución de 10 mg/ml de proteinasa K (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), se procedió a homogeneizar de nuevo, se añadieron 125 µl de SDS al 20% y se mezcló todo por inversión. El homogeneizado se sometió a digestión durante 2-3 horas a 65° C. Finalizada la digestión, se adicionaron a cada tubo 2.5 ml de Solución tampón 2 (**Tabla 2.7**). Seguidamente, se procedió a realizar una extracción fenol-cloroformo para la cual se añadió a cada tubo un volumen de una solución comercial de fenol ADN, pH 8. Los tubos se agitaron con ayuda de un agitador mecánico y se centrifugaron durante 15 minutos a 4000 rpm, a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo estéril y se extrajo con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se agitó la mezcla y centrifugó de nuevo durante 5 minutos a 4000 rpm, a temperatura ambiente. Se recogió nuevamente la fase acuosa en un nuevo tubo estéril, y se procedió a la precipitación del ADN con 2-2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, a -20° C durante toda una noche. Tras la precipitación, se centrifugaron los tubos a 4000 rpm, durante 15 minutos a 4° C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 2 ml de etanol frío al 70%. Se realizó una última centrifugación a 4000 rpm, durante 15 minutos a 4° C y se procedió a la decantación final del sobrenadante. El precipitado de ADN se dejó secar y se disolvió en 200 µl de agua ultra pura estéril.

| SOLUCIÓN | COMPOSICIÓN |
|--------------------------|---|
| Solución tampón 1 | Tris HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y NaCl 0.15 M |
| Solución tampón 2 | Tris HCl 10 mM pH 7.5; EDTA 10 mM y NaCl 0.65 M |

Tabla 2.7. Composición de las Soluciones tampón para la extracción de ADN.

La lectura espectrofotométrica a 260 nm permitió determinar la concentración de ADN extraído: una unidad de densidad óptica a 260 nm se corresponde con una concentración de ADN de doble cadena de 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Se emplearon cubetas de cuarzo para la valoración de 2 µl de ADN diluido en 98 µl de agua libre de nucleasas, y como *blanco* se empleó agua libre de nucleasas. También se midió la absorbancia a 280 nm (A_{280}) para estimar la pureza del ADN: considerándose un grado de pureza óptimo si el cociente $A_{260} / A_{280} \geq 1.8$.

La integridad del ADN aislado se determinó mediante el desarrollo de una electroforesis, de igual modo que en el caso del ARN, visualizándose una única banda de gran tamaño.

Las muestras se almacenaron a -20° C hasta su uso.

2.4. Extracción y valoración de proteínas.

Para obtener los extractos proteicos a partir de los tejidos, se realizaron secciones finas de las muestras tisulares congeladas e incluidas en medio congelante (Jung Tissue Freezing Medium™, Leica Microsystems).

Los fragmentos obtenidos correspondientes a cada muestra se incluyeron en un tubo estéril que contenía 300 µl del reactivo de lisis, con inhibidores de proteasas y ARNasas, incluido en el kit *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA*® (Roche, Basilea, Suiza). A continuación, se procedió a homogeneizar la mezcla; el vástago empleado se mantuvo la noche anterior en NaOH 4N, y se aclaró con agua ultra pura estéril, tanto al inicio como entre cada uso. Tras la homogeneización, las muestras reposaron durante 30 minutos en hielo, para favorecer la extracción proteica y se centrifugaron durante 20 minutos a 12000 rpm a 4° C. Después de la centrifugación, el sobrenadante, que contenía las proteínas, se dividió en dos nuevos tubos estériles. Las alícuotas con el extracto proteico se conservaron a -80° C hasta su uso.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando el reactivo comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos). Este ensayo se basa en la observación del cambio de absorbancia (de 465 a 595 nm) que se produce cuando se añaden proteínas a una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250. Las interacciones hidrofóbicas e iónicas producidas por aminoácidos básicos (principalmente arginina) estabilizan la forma aniónica del reactivo indicador, causando un cambio de color visible. Para cada una de las muestras se añadieron 200 µl del reactivo comercial y 800 µl de agua ultra pura estéril a una cubeta para espectrofotómetro, con capacidad de 1 ml. Se valoraron 4 µl de extracto proteico correspondiente a cada una de las muestras (diluídas 1:5 ó 1:10), empleando como *blanco* 1 ml de la solución comercial diluida 5 veces. Se realizó una curva de calibrado de 0 a 10 µg/ml a partir de una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) de 2 mg/ml (Bio-Rad). La concentración de proteínas de cada muestra se determinó a partir de la absorbancia medida a 595 nm. La cuantificación se realizó por duplicado.

2.5. Determinación de los niveles proteicos de DAPK1 mediante Western-Blot.

2.5.1. Preparación de las muestras para electroforesis.

De acuerdo a los resultados obtenidos en “3.4.1. La expresión génica y el estatus telomérico”, se chequearon los niveles proteicos de DAPK1 en cuatro muestras tumorales, y en la respectiva muestra control, para cada una de ellas (véase más adelante).

Para cada una de las muestras, un volumen del extracto proteico equivalente a 100 µg de proteínas, se mezcló con el tampón de Laemmli (1X), (Laemmli, 1970), (Tris 72 mM, pH 7.6, glicerol 10% (v/v), SDS 1% (p/v), azul de bromofenol 0.002% (p/v), y β-mercaptoetanol 2mM), completando la mezcla hasta un volumen final de 50 µl, con el tampón de electroforesis (véase la composición a continuación); y posteriormente se calentó a 95° C, durante 5 minutos. La línea celular humana de carcinoma de pulmón, A549, se utilizó como control positivo en el ensayo. En este caso, se empleó un volumen del extracto proteico equivalente a 50 µg.

2.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

La electroforesis se desarrolló en un gel de poliacrilamida, compuesto de un gel concentrador (5%) y un gel separador (7%). El primero, que contiene los pocillos de depósito, sirve para alinear las muestras; el segundo, para separar las proteínas. La concentración de poliacrilamida utilizada en el gel separador se determinó considerando el peso molecular de DAPK1 (160 kDa). La composición de los geles se detalla en la siguiente tabla (**Tabla 2.8**). El tampón utilizado para el desarrollo de la electroforesis contenía Tris 0.25 M, glicina 1.9 M y SDS 1%. La técnica se desarrolló en un Mini Protean II TM (Bio-Rad), empleando una fuente PowerPac (Bio-Rad), durante 105 minutos, a 100 V, a temperatura ambiente. En el gel se cargaron los extractos proteicos de las ocho muestras antes mencionadas, junto con un patrón de pesos moleculares (Precision Plus ProteinTM Standards, Dual Color, Bio-Rad) y el extracto proteico correspondiente al control positivo.

| SOLUCIÓN | GEL CONCENTRADOR (5%) (Volúmenes) | GEL SEPARADOR (7%) (Volúmenes) |
|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Agua (ml) | 3.04 | 5.59 |
| Tris 1.5 M (ml) | | 2.5 |
| Tris 0.5 M (ml) | 1.25 | |
| SDS 10% (μl) | 50 | 100 |
| Acr/bisAcr 40% (ml) | 0.625 | 1.75 |
| Persulfato de amonio 10% (μl) | 25 | 50 |
| TEMED (μl) | 10 | 10 |

Tabla 2.8. Composición de los geles concentrador y separador. SDS, dodecilsulfato sódico; Acr/bisAcr 40%, solución comercial de acrilamida/bis acrilamida (40% acrilamida/Bis solution, 19:1, Bio-Rad); TEMED, N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina.

2.5.3. Transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Protran[®], Nitrocellulose Transfer Membrane; Whatman, Schleicher & Schuell, New Hampshire, Estados Unidos), mediante el paso de corriente eléctrica, de acuerdo al protocolo de transferencia semi-seca. Para ello, se colocaron tres papeles Whatman[®] (Chromatography Paper, 3MM Chr, Whatman[®], GE Healthcare), la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida, y finalmente, tres papeles Whatman[®] más. La transferencia se desarrolló en el equipo Transfer-blot SD Semi-dry (Bio-Rad), durante 45 minutos, a 15 V y a temperatura ambiente. La composición del tampón de transferencia se describe en la siguiente tabla (**Tabla 2.9**).

| SOLUCIÓN | CONCENTRACIÓN (5X) |
|-------------|--------------------|
| Glicina | 39 mM |
| Metanol | 20% (v/v) |
| SDS | 0.04% |
| Tris pH 8.3 | 48 mM |

Tabla 2.9. Composición del tampón de transferencia en semi-seco.

2.5.4. Bloqueo e incubación con anticuerpos.

Finalizada la transferencia, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos a proteínas. Para ello, la membrana se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave, en TBS (Tris 0.01 M, ClNa 0.15 M, pH 8.0) con Tween-20 al 0.05% (v/v), TTBS y suplementado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada (TTBSM, TTBS *Milk*, o Solución de bloqueo). Transcurrido el tiempo de incubación con la solución de bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario para DAPK1 y β -actina (utilizada como control de carga), (**Tabla 2.10**), durante toda una noche, en agitación suave y a 4° C.

| ANTICUERPO | CASA COMERCIAL | ORIGEN | DILUCIÓN (en TTBSM) |
|----------------------------------|----------------|-----------|------------------------|
| DAPK1 | Sigma (D 2178) | IgG ratón | 1:500 |
| β-actina | Sigma (A 5441) | IgG ratón | 1:4000 |

Tabla 2.10. Anticuerpos primarios utilizados en el ensayo de Western-blot. TTBSM, TBS (Tris 0.01M, ClNa 0.15M, pH 8.0) con Tween-20 al 0.05% (v/v), TTBS y suplementado con 5% (p/v) de leche en polvo desnatada.

Al día siguiente, la membrana se sometió a tres lavados con TTBS, de 15 minutos cada uno de ellos, en agitación fuerte, a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario (conjugado con peroxidasa), anti-ratón (Sigma, A 4416), en una dilución 1:5000, para la detección de DAPK1, y 1:1800, para la detección de β -actina, ambos diluidos en TTBSM. La incubación se realizó en agitación suave, durante 1 hora a temperatura ambiente. Y una vez finalizada, la membrana se volvió a lavar del mismo modo que se describió anteriormente.

2.5.5. Detección quimioluminiscente.

La detección de los inmunocomplejos se efectuó por quimioluminiscencia, tratando la membrana con el reactivo Pierce® ECL 2, Western Blotting Substrate (Rockford, IL, Estados Unidos), y exponiéndola después a una película radiográfica (Amersham Hyperfilm™ MP). Tras la exposición, la película se reveló en el procesador Curix 60 AGFA (AGFA, Mortsel, Bélgica). Las películas fueron posteriormente digitalizadas con un escáner.

Los *blots* fueron cuantificados usando la herramienta “Analyze Gels” de ImageJ. Fueron seleccionadas regiones rectangulares de la misma área para todos los puntos del *blot*, y se obtuvieron representaciones de la densidad de la señal a lo largo de la región seleccionada. Se dibujó una línea base y se obtuvo el área bajo la curva, indicativa de la señal relativa de cada punto. Los resultados fueron siempre normalizados con la señal del control invariable, β -actina.

2.6. Determinación de la actividad telomerasa.

La detección de la actividad telomerasa se llevó a cabo empleando el kit comercial *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA*[®] (Roche). Se trata de una ampliación del método descrito por Kim *et al.* (Kim *et al.*, 1994).

Se desarrolla en dos pasos: en un primer paso (**elongación y amplificación**, pasos 1 y 2; **Figura 2.2**), la enzima telomerasa añade repeticiones teloméricas (TTAGGG) al extremo 3' del cebador sintético biotinilado P1-TS. Estos productos de elongación de la telomerasa son amplificados por PCR usando los cebadores P1-TS y P2, generando así secuencias que difieren de tamaño en 6 pb.

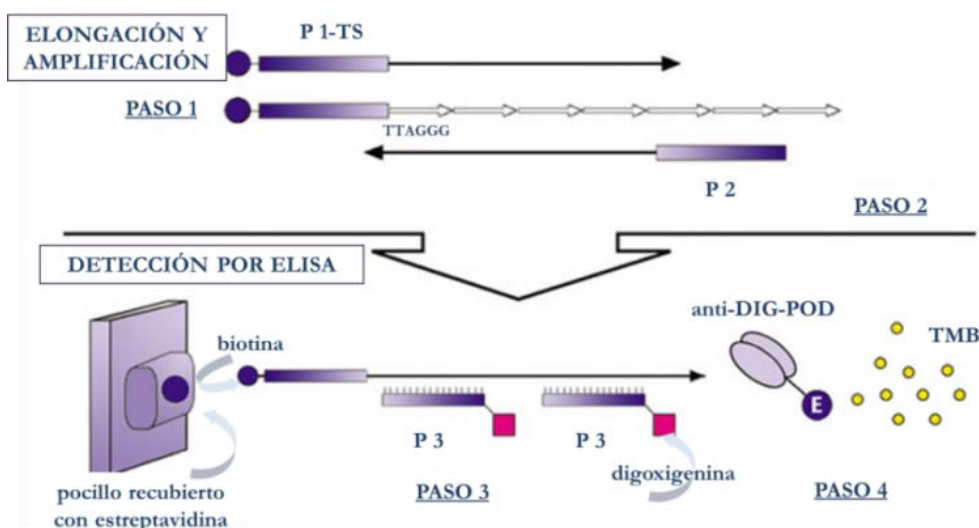


Figura 2.2. Representación esquemática de la determinación de la actividad telomerasa. Adaptado de <https://www.roche-applied-science.com>.

En un segundo paso (**detección por ELISA**, pasos 3 y 4; **Figura 2.2**), los fragmentos amplificados por PCR son desnaturalizados e hibridados con una sonda específica marcada con digoxigenina (P3), cuya secuencia es complementaria a la de las repeticiones teloméricas. El producto resultante es inmovilizado por medio del cebador P1-TS, marcado con biotina, en los pocillos recubiertos de estreptavidina de una placa de ELISA. El producto resultante inmovilizado es entonces detectado con un anticuerpo anti-digoxigenina (anti-DIG-POD, anti-digoxigenina-peroxidasa; anti-

cuerpo policlonal procedente de oveja) conjugado con peroxidasa. La peroxidasa cataliza la conversión del sustrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) en un producto coloreado (azul), cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de ADN telomérico añadido por la telomerasa.

2.6.1. Elongación y amplificación.

A partir del extracto proteico extraído de cada una de las muestras tumorales y no tumorales, se dispuso en tubos para PCR el volumen correspondiente a 10-15 μg de proteína. Se añadieron a cada uno de los tubos 25 μl de la mezcla de reacción (tampon Tris, cebador P1-TS marcado con biotina, cebador P2, nucleótidos y Taq polimerasa), hasta completar un volumen final de 50 μl con agua libre de nucleasas. Se ha descrito la existencia en numerosos tejidos de inhibidores de la Taq polimerasa, y los extractos que contienen dichos inhibidores vuelven a ser *amplificables* tras dilución (Wright *et al.*, 1995). Por ello el ensayo se realizó también en diluciones 1/10 de los extractos proteicos de todas las muestras, con el fin de controlar la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa, que podían ofrecer resultados falsos negativos.

Como control positivo se utilizó un extracto celular procedente de una línea humana de células de riñón (línea 293) immortalizadas, que expresaban telomerasa, a una concentración aproximada de 10^3 células/ μl . En un tubo para PCR se incluyeron 3 μl del control positivo, 25 μl de la mezcla de reacción y 22 μl de agua libre de nucleasas. Así mismo, se preparó un control negativo: para ello se tomaron 3 μl del control positivo a los que se les añadieron 7 μl de agua libre de nucleasas, la mezcla se incubó durante 10 minutos a 85° C. A continuación, se mantuvo 5 minutos en hielo y se le incorporó 1 μl de enzima ARNasa (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; RNase, DNase-free, Roche). Finalmente, se incubó durante 30 minutos a 37° C, se le añadieron 25 μl de la mezcla de reacción y 15 μl de agua libre de nucleasas. Con este tratamiento se logró la degradación del componente ARN de la telomerasa, destruyéndose la actividad enzimática.

Todos los tubos se sometieron al siguiente programa en un termociclador (**Tabla 2.11**).

| FASE | TIEMPO | TEMPERATURA (° C) | NÚMERO DE CICLOS |
|-----------------------------------|---------------|----------------------|---------------------|
| Elongación | 10-30 minutos | 25 | 1 |
| Inactivación de telomerasa | 5 minutos | 94 | 1 |
| Amplificación | | | |
| Desnaturalización | 30 segundos | 94 | 1-30 |
| Hibridación | 30 segundos | 50 | |
| Elongación | 90 segundos | 72 | |
| Elongación final | 10 minutos | 72 | 1 |
| Mantenimiento | | 4 | ∞ |

Tabla 2.11. Condiciones de PCR para la determinación de la actividad telomerasa.

2.6.2. Detección por ELISA.

Una vez finalizada la PCR, y en nuevo tubo estéril, se incubaron 5 µl del producto amplificado de cada una de las muestras no tumorales y tumorales, así como de los controles, con 20 µl del reactivo de desnaturalización (solución de hidróxido sódico, <0.5%), durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadieron 225 µl de la solución de hibridación que incluía la sonda P3, complementaria a las repeticiones teloméricas y marcada con digoxigenina. La mezcla se agitó vigorosamente con ayuda de un agitador mecánico, y se transfirieron 100 µl de cada una de las mezclas a cada uno de los pocillos recubiertos con estreptavidina de la placa de ELISA. La placa se cubrió con una lámina autoadhesiva para impedir la evaporación y se incubó durante 2 horas a 37° C con agitación (300 rpm).

Tras la incubación, se retiró la solución de hibridación y cada pocillo de la placa se lavó 3 veces con 250 µl de la solución de lavado 1X. A continuación, se incorporaron a cada pocillo 100 µl del anti-DIG-POD (0.5 U/ml), la placa se cubrió nuevamente con una lámina autoadhesiva, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, con agitación (300 rpm). Transcurrido el tiempo, se eliminó la solución y cada uno de los pocillos se lavó 5 veces con 250 µl de la solución de lavado 1X. Finalmente, se añadieron 100 µl del sustrato TMB, previamente atemperado, y la placa cubierta con una lámina autoadhesiva se incubó con agitación (300 rpm) a temperatura ambiente durante 20 minutos, hasta que se observó la aparición de color azul en los pocillos. Sin retirar el reactivo anterior, se adicionaron 100 µl del reactivo de parada (solución de ácido sulfúrico <5%), para detener la reacción. Esto provocó el viraje del color azul a amarillo, lo cual es requerido para lograr la máxima sensibilidad.

Con el programa bioinformático Microplate manager[®] (Bio-Rad) se midió la absorbancia de cada pocillo a 450 nm, empleando una longitud de onda de referencia de 690 nm. Para la interpretación de los resultados se consideraron “muestras telomerasa positivas” aquellas en las que la diferencia de las absorbancias ($A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$) fue superior a 0.2. El control positivo y el control negativo se consideraron válidos cuando la diferencia de absorbancias fue superior a 1.5 e inferior a 0.2, respectivamente.

2.7. Medida de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción.

La medida de la longitud de los fragmentos teloméricos se llevó a cabo empleando el kit *TeloTAGGG Telomere Length Assay*[®] (Roche). Inicialmente, el ADN genómico es sometido a digestión mediante el uso de una mezcla de enzimas de restricción. Tras la digestión, los fragmentos de ADN son separados en un gel de electroforesis y transferidos a una membrana de nailon por *Southern blotting*. Los fragmentos de ADN transferidos, son hibridados con una sonda marcada con digoxigenina, específica para las repeticiones teloméricas, e incubados con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado covalentemente a la fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP; DIG *antibody coupled to Alkaline Phosphate*). La metabolización del sustrato CDP-*Star* por esta enzima genera una señal quimioluminiscente que permite visualizar los fragmentos teloméricos (**Figura 2.3**).



Figura 2.3. Representación esquemática del protocolo para la medida de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción.

Para cada una de las muestras de tejidos no tumorales y tumorales, el volumen correspondiente a 2.5 µg de ADN genómico fue sometido a digestión con las enzimas de restricción Hinf I y Rsa I. La digestión tuvo lugar en un volumen de reacción de 20 µl que contenía el tampón de digestión 1X y 20 U/µl de cada una de las enzimas. Se emplearon como controles, una muestra de ADN con telómeros de alto y/o bajo

peso molecular. La digestión se desarrolló durante 2 horas a 37° C. Finalizada la digestión, se añadieron 4 µl del tampón de carga para detener la reacción.

Los fragmentos de ADN digeridos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X (TAE 50X: Tris 2M, EDTA 50 Mm y 57.1 ml de ácido acético glacial, pH 8) junto con un marcador de peso molecular previamente preparado (3 µl del marcador proporcionado por el kit, 5 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl del tampón de carga). La migración de los fragmentos transcurrió en un tiempo aproximado de 4 horas, a 83 V.

Finalizada la electroforesis, el gel de agarosa se trató durante 10 minutos con una solución de HCl 0.25 M y a continuación se aclaró 2 veces con agua destilada. Posteriormente, se sumergió 2 veces, durante 15 minutos, en una solución de desnaturalización (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M), con agitación suave a temperatura ambiente. El gel se aclaró de nuevo dos veces con agua destilada, y se sumergió en una solución de neutralización (Tris-HCl 0.5 M, NaCl 3M, pH 7.5), en dos ocasiones, durante 15 minutos, con agitación suave y a temperatura ambiente.

El ADN se transfirió desde el gel a una membrana de nailon cargada positivamente durante toda una noche. La membrana se activó previamente con agua ultra pura estéril durante 7 minutos. Se empleó como tampón de transferencia SSC 20X (NaCl 3 M, citrato sódico 0.3 M, pH 7). Concluida la transferencia, el ADN se fijó a la membrana por exposición a luz ultravioleta de 254 nm durante 7 minutos y posterior calentamiento a 80° C, durante 30 minutos.

La membrana se lavó con SSC 2X, y se introdujo en un cilindro de hibridación con 18 ml de solución de prehibridación precalentada a 42° C. La prehibridación tuvo lugar durante 60 minutos, con rotación. Transcurrido el tiempo, esta solución se retiró y reemplazó por 10 ml de solución de hibridación que incluía 2 µl de la sonda marcada con digoxigenina. La hibridación tuvo lugar durante 3 horas, a 42° C con rotación.

Transcurrida la hibridación, se realizaron 2 lavados, de 5 minutos cada uno, con la solución astringente de lavado I (SSC 2X, SDS 0.1%) a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron otros 2 lavados, de 15 minutos cada uno, con la solución astringente de lavado II (SSC 0.2X, SDS 0.1%), a 50° C. Un último lavado de 4 minutos de duración se llevó cabo con el tampón de lavado 1X incluido en el kit, a temperatura ambiente.

Tras los lavados, la membrana se bloqueó durante 30 minutos con 70 ml de solución de bloqueo 1X, a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo, se añadieron a la solución anterior 7 µl del anticuerpo anti-digoxigenina (75 mU/ml) unido covalen-

temente a la fosfatasa alcalina, la incubación con el anticuerpo se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

A continuación, se realizaron dos lavados de 15 minutos con el tampón de lavado 1X, a temperatura ambiente. Tras el último lavado, la membrana se incubó a temperatura ambiente con 100 ml de solución de detección 1X.

Finalmente, se procedió al revelado: la membrana se puso en contacto durante 15 segundos y a temperatura ambiente con 11.2 ml de agua ultra pura estéril, 1.250 ml de la solución de detección 10X y 5 ml del reactivo de revelado. Con ayuda de un papel de filtro se retiró el exceso de líquido, y la membrana se autorradiografió para su posterior revelado y análisis.

Las películas (Amersham HyperfilmTM MP (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido)) se escanearon con el programa informático Quantity one[®] (Bio-Rad). La cuantificación se realizó comparando los resultados obtenidos en cada muestra tumoral con su pareja no tumoral, empleando el *software* Image gauge 3.46[®] (Fujifilm, Tokyo, Japón.). La heterogeneidad entre los telómeros de distintos cromosomas y células determina que, tras la hibridación con la sonda complementaria a las repeticiones teloméricas, no se obtenga una única banda, sino un *arrastre* que abarca todas las longitudes de los fragmentos teloméricos presentes en cada muestra. En cada caso, se estableció el parámetro de longitud de telómeros, que corresponde al valor de la longitud telomérica medida en Kb, calculado teniendo en cuenta las diferentes intensidades de la señal de hibridación en función del tamaño. Cuanto mayor es el peso molecular del fragmento, mayor es la densidad óptica (debido a las múltiples hibridaciones que suceden), por lo que es necesaria una homogeneización que permita eliminar el sesgo que esto produce. Para ello se determinó la longitud media de los fragmentos teloméricos, en cada muestra, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Media} = (\text{DO}_i) / (\text{DO}_i / L_i)$$

DO_i es la densidad óptica en la posición i y L_i es la longitud de los fragmentos teloméricos, en Kb, en esa posición.

2.8. Ensayo de expresión génica con matrices de oligonucleótidos.

El estudio de expresión de ARN se realizó con matrices de oligonucleótidos comerciales. Se eligieron 2 tipos de membranas:

- *Oligo GEArray[®] Human p53 Signaling Pathway Microarray* (SABiosciences, Spoorstraat, KJ Venlo, Países Bajos), que incluía un total de 113 secuencias de oligonucleótidos correspondientes a genes relacionados con la transducción de señales mediadas por p53.
- *Oligo GEArray[®] Human Cancer PathwayFinder* (SABiosciences), que incluía un total de 113 secuencias de oligonucleótidos correspondientes a genes representativos de 6 rutas biológicas implicadas en la transformación y génesis de tumores: control del ciclo celular y reparación de daño en el ADN, apoptosis y senescencia celular, moléculas de transducción de señales y factores de transcripción, adhesión, angiogénesis, invasión y metástasis.

Se muestran a continuación los genes incluidos en las membranas de acuerdo a sus funciones y distribución, y **Figuras 2.4 y 2.5**).

Oligo GEArray[®] Human p53 Signaling Pathway Microarray

Apoptosis:

Inducción de la apoptosis: *BAK1, BAX, BID, CDKN1A, CRADD, DAPK1, EI24, FADD, FOXO3A, PCBP4, PLAGL1, PRKCA, PYCARD, TNFRSF10B, TNFSF6, TP53, TP73, TP73L*.

Anti-apoptóticos: *A4TF, BAG1, BCL2, BCL2A1, BIRC5, BNIP3, CASP2, HDAC1, IGF1R, MCL1, NFKB1, REL4, SNCA, TNF*.

Otros genes apoptóticos: *APAF1, BRCA1, CASP9, DAXX, E2F1, FAF1, GADD45A, GML, LRDD, P53AIP1, PPP1R13B, RAI, SLAH1, SIRT1, TP53BP2, TRAF2, TRAF4, TRAF5*.

Ciclo celular:

Detención del ciclo celular: *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CHEK1*, *CHEK2*, *GADD45A*, *GAS1*, *GML*, *GTSE1*, *MYC*, *PCAF*, *PCBP4*, *PLAGL1*, *PPP1R9B*, *RPRM*, *SESN1*, *SESN2*, *SESN3*.

Puntos de control del ciclo celular: *ATR*, *BRCA1*, *CCNE2*, *CCNG2*, *CDKN2A*, *RB1*, *TP53*.

Regulación negativa del ciclo celular: *ATM*, *BAX*, *BRCA1*, *CDKN2A*, *MSH2*, *NF1*, *PTEN*, *PYCARD*, *RB1*, *SMARCB1*, *TP53*, *TP73*, *TP73L*, *TSC1*, *TSC2*, *WT1*.

Regulación del ciclo celular: *BRCA2*, *CDC2*, *CDC25A*, *CDK4*, *CDK7*, *E2F1*, *E2F3*, *FRAP1*, *GAK*, *HK2*, *IGF1R*, *KRAS2*, *PLK1*, *PPM1D*, *PRKCA*, *SFN*, *STAT1*, *TADA3L*, *TP53BP2*.

Otros genes del ciclo celular: *BIRC5*, *CCNH*, *ESR1*.

Crecimiento, proliferación y diferenciación celular:

Regulación negativa de la proliferación celular: *BAI1*, *BAP1*, *BCL2*, *BTG2*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, *CHEK1*, *GAS1*, *GML*, *IFNB1*, *IL6*, *MDM2*, *MDM4*, *NF1*, *PCAF*, *PMP22*, *PPM1D*, *SESN1*.

Regulación positiva de la proliferación celular: *CLA01*, *IGF1R*, *IL6*, *SHC1*, *TSHR*.

Proliferación celular: *BRCA1*, *CDC25A*, *CDC25C*, *CDK4*, *CDK7*, *CYR61*, *E2F1*, *MYC*, *PLK1*, *PPP1R9B*, *PRKCA*, *SCGB3A1*, *SFN*.

Crecimiento celular y diferenciación: *COPEB*, *CYR61*, *ESR1*, *MCL1*, *MYOD1*, *NDRG1*, *PPP1R9B*, *PRKCQ*, *SCGB3A1*, *SHC1*.

Otros genes relacionados con el crecimiento, proliferación y diferenciación celular: *FOXO3A*, *JUN*, *KRAS2*, *PHB*, *PML*, *PTTG1*, *TSC2*.

Genes de reparación del ADN: *ATM*, *ATR*, *BRCA1*, *BTG2*, *CCNH*, *CDK7*, *FRAP1*, *GADD45A*, *MSH2*, *PTTG1*, *TP53*.

Oligo GEArray[®] Human Cancer PathwayFinder Microarray

Control del ciclo celular y reparación del daño en el ADN: *ATM, BRCA1, BRCA2, CCND1 (ciclina D1), CCNE1 (ciclina E1), CDC25A, CDK2, CDK4, CDKN1A (p21Waf1), CDKN1B (p27Kip1), CDKN2A (p16Ink4), CHEK2 (chk2 / Rad53), E2F1, MDM2, PRKDC (DNA-PK), PTEN, S100A4, RB1, TP53 (p53).*

Apoptosis y senescencia celular: *APAF1, BAD, BAX, BCL2, BCL2L1 (bcl-X), BIRC5 (Survivina), CASP8, CASP9, CFLAR (CASPER), GZMA, HTATIP2, TERT (telomerasa), TNFRSF1A (TNF- α receptor), TNFRSF6 (Fas), TNFRSF10B (DR5), TNFRSF25 (DR3).*

Moléculas de transducción de señales y factores de transcripción: *AKT1, CTNNB1 (β -catenina), ERBB2, ETS2, FOS, JUN, MAPK14 (p38 MAPK), MAP2K1 (MEK), MYC, NFKB1 (NF- κ B), NFKBL1 (I κ B α), PIK3CB (PI3K p110b), PIK3R1 (PI3K p85a), RAF1, RASA1, SNCG, SRC.*

Adhesión: *CD44, CDH1 (E-cadherina), ICAM1, ITGA1 (integrina α 1), ITGA2 (integrina α 2), ITGA3 (integrina α 3), ITGA4 (integrina α 4), ITGA5 (integrina α 5), ITGA6 (integrina α 6), ITGAV (integrina α V), ITGB1 (integrina β 1), ITGB3 (integrina β 3), ITGB5 (integrina β 5), MCAM, MICA (MUC18), MTSS1, NCAM1, PNN, SYK, UCC1.*

Angiogénesis: *ANGPT1 (angiopoyetina-1), ANGPT2 (angiopoyetina-2), BAI1, COL18A1 (endostatina), EGF, EGFR, FGF2 (bFGF), FGFR2, FLT1 (VEGFR), HGF, IFNA1 (IFN α), IFNB1 (IFN β), IGF1, IL8, PDGFA, PDGFB, TEK (tie-2), TGFB1, TGFB1 (ALK-5), THBS1 (trombospondina-1), THBS2 (trombospondina 2), TNF, VEGF.*

Invasión y metástasis: *KISS1, KAI1, MET, MMP1 (colagenasa-1), MMP2 (gelatinasa A), MMP9 (gelatinasa B), MTA1, MTA2, NME1, NME4 (Nm23), PLA1, PLA2, S100A4, SERPINB2 (PAI2), SERPINB5 (maspina), SERPINE1 (PAI1), TIMP1, TIMP3, TWIST1.*

| | A | B | C | D | E | F | G | H |
|----|---------------|------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | RPS27A | AATF | APAF1 | ATM | ATR | BAG1 | BAI1 | BAK1 |
| 2 | BAP1 | BAX | BCL2 | BCL2A1 | BID | BIRC5 | BNIP3 | BRCA1 |
| 3 | BRCA2 | BTG2 | CASP2 | CASP9 | CCNE2 | CCNG2 | CCNH | CDC2 |
| 4 | CDC25A | CDC25C | CDK4 | CDK7 | CDKN1A | CDKN2A | CHEK1 | CHEK2 |
| 5 | CIAO1 | KLF6 | CRADD | CYR61 | DAPK1 | DAXX | E2F1 | E2F3 |
| 6 | EI24 | ESR1 | FADD | FAF1 | FOXO3 | FRAP1 | GADD45A | GAK |
| 7 | GAS1 | GML | GTSE1 | HDAC1 | HK2 | IFNB1 | IGF1R | IL6 |
| 8 | JUN | KRAS | LRDD | MCL1 | MDM2 | MDM4 | MSH2 | MYC |
| 9 | MYOD1 | NDRG1 | NF1 | NFKB1 | P53AIP1 | PCAF | PCBP4 | PHB |
| 10 | PLAGL1 | PLK1 | PML | PMP22 | PPM1D | PPP1R13B | PPP1R9B | PRKCA |
| 11 | PRKCQ | PTEN | PTTG1 | PYCARD | PPP1R13L | RB1 | RELA | RPRM |
| 12 | SCGB3A1 | SESN1 | SESN2 | SESN3 | SFN | SHC1 | SIAH1 | SIRT1 |
| 13 | SMARCB1 | SNCA1 | STAT1 | TADA3L | TNF | TNFRSF10B | FASLG | TP53 |
| 14 | TP53BP2 | TP73 | TP73L | TRAF2 | TRAF4 | TRAF5 | TSC1 | TSC2 |
| 15 | TSHR | WT1 | <i>PUC18</i> | <i>Blank</i> | <i>Blank</i> | <i>AS1R2</i> | <i>AS1R1</i> | <i>AS1</i> |
| 16 | GAPDH | B2M | HSP90AB1 | HSP90AB1 | ACTB | ACTB | BAS2C | BAS2C |

Figura 2.4. Distribución de las secuencias de oligonucleótidos en *Oligo GEArray® Human p53 Signaling Pathway Microarray*.

Los *blancos* se muestran en cursiva y los normalizadores, en negrita.

| | A | B | C | D | E | F | G | H |
|----|---------------|------------|-----------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | RPS27A | AKT1 | ANGPT1 | ANGPT2 | APAF1 | ATM | BAD | BAI1 |
| 2 | BAX | BCL2 | BCL2L1 | BIRC5 | BRCA1 | BRCA2 | CASP8 | CASP9 |
| 3 | CCND1 | CCNE1 | CD44 | CDC25A | CDH1 | CDK2 | CDK4 | CDKN1A |
| 4 | CDKN1B | CDKN2A | CFLAR | CHEK2 | COL18A1 | CTNNB1 | E2F1 | EGF |
| 5 | EGFR | ERBB2 | ETS2 | FGF2 | FGFR2 | FLT1 | FOS | GZMA |
| 6 | HGF | HTATIP2 | ICAM1 | IFNA1 | IFNB1 | IGF1 | IL8 | ITGA1 |
| 7 | ITGA2 | ITGA3 | ITGA4 | ITGA5 | ITGA6 | ITGAV | ITGB1 | ITGB3 |
| 8 | ITGB5 | JUN | CD82 | KISS1 | MAP2K1 | MAPK14 | MCAM | MDM2 |
| 9 | MET | MICA | MMP1 | MMP2 | MMP9 | MTA1 | MTA2 | MTSS1 |
| 10 | MYC | NCAM1 | NFKB1 | NFKBIA | NME1 | NME4 | PDGFA | PDGFB |
| 11 | PIK3CB | PIK3R1 | PLAU | PLAUR | PNN | PRKDC | PTEN | RAF1 |
| 12 | RASA1 | RB1 | S100A4 | SERPINB2 | SERPINB5 | SERPINE1 | SNCG | SRC |
| 13 | SYK | TEK | TERT | TGFB1 | TGFBR1 | THBS1 | THBS2 | TIMP1 |
| 14 | TIMP3 | TNF | TNFRSF10B | TNFRSF1A | TNFRSF25 | FAS | TP53 | TWIST1 |
| 15 | EPDR1 | VEGFA | <i>PUC18</i> | <i>Blank</i> | <i>Blank</i> | <i>AS1R2</i> | <i>AS1R1</i> | <i>AS1</i> |
| 16 | GAPDH | B2M | HSP90AB1 | HSP90AB1 | ACTB | ACTB | BAS2C | BAS2C |

Figura 2.5. Distribución de las secuencias de oligonucleótidos en *Oligo GEArray® Human Cancer PathwayFinder*.

Los *blancos* se muestran en cursiva y los normalizadores, en negrita.

El estudio de expresión de ARN mediante matrices de oligonucleótidos comerciales se fundamenta en una transcripción reversa inicial del ARN a ADN complementario (ADNc), para proceder a continuación a la síntesis y amplificación del ARN antisentido (ARNc) marcado con biotina-16-uridina-5'-trifosfato (biotina-16-UTP). Tras la purificación del ARNc marcado, éste se hibrida con la membrana que contiene las secuencias de oligonucleótidos. La incubación posterior de la membrana con la solución que incluye estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina permite realizar una detección quimioluminiscente, previa adición del sustrato quimioluminiscente CDP-*Star* (**Figura 2.6**). Con este protocolo se comparó el perfil de expresión génica de tumores no microcíticos de pulmón *vs.* tumores colorrectales, con acortamiento telomérico.

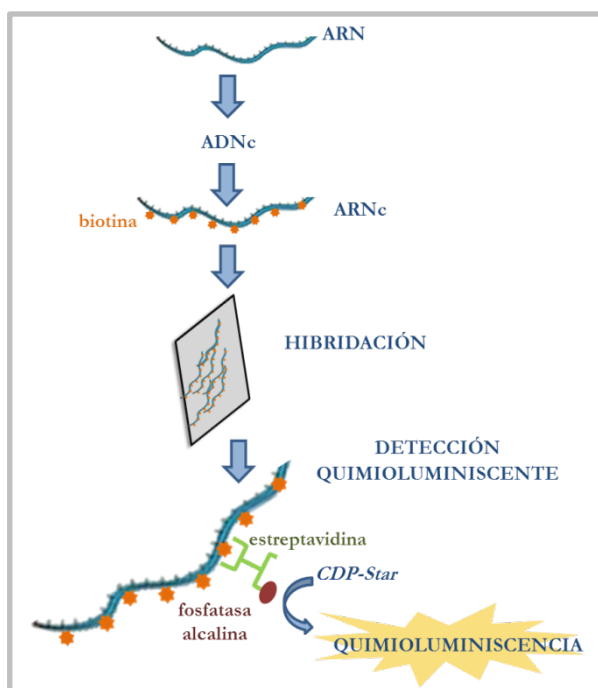


Figura 2.6. Representación esquemática del ensayo de expresión génica con matrices de oligonucleótidos.

2.8.1. Calidad del ARN y síntesis del ADNc.

Con el fin de garantizar óptimos resultados, el ARN de las muestras tumorales seleccionadas para este ensayo debía cumplir los siguientes requisitos:

- concentración superior a 11 ng/μl.
- $A_{260}/A_{280} > 2$.
- $A_{260}/A_{230} > 1.7$.

- Discriminación nítida de las bandas correspondientes al ARN ribosómico 18S y 28S.

En esta fase inicial del ensayo y hasta la síntesis del ARNc, se empleó el kit comercial Truelabeling-AMP™ 2.0 (SuperArray-Bioscience Corporation®, SABiosciences).

Para cada una de las muestras tumorales que se seleccionaron para el ensayo se preparó la siguiente mezcla de reacción: el volumen correspondiente a 3 µg de ARN, 1 µl del *TrueLabeling Primer* y se completó el volumen hasta 10 µl con agua libre de nucleasas, en un tubo para PCR. La mezcla se incubó en un termociclador durante 10 minutos a 70° C. En este primer paso previo se produjo la desnaturalización de los componentes de la mezcla para evitar la formación de posibles estructuras secundarias.

A continuación, se preparó la siguiente mezcla para la síntesis de ADNc (**Tabla 2.12**).

| COMPONENTE | VOLUMEN (µl) POR REACCIÓN |
|--|---------------------------|
| Agua libre de ARNasas | 4 |
| Tampón de síntesis 5X de ADNc | 4 |
| Inhibidor de ARNasas | 1 |
| Mezcla con la enzima de síntesis de ADNc | 1 |
| Volumen final | 10 |

Tabla 2.12. Mezcla de reacción para la transcripción reversa (ensayo con matrices de oligonucleótidos).

Esta mezcla se añadió y mezcló con los 10 µl anteriores que contenían el ARN de la fase previa de desnaturalización (volumen final 20 µl). La nueva mezcla se incubó en un termociclador a las siguientes condiciones (**Figura 2.7**).

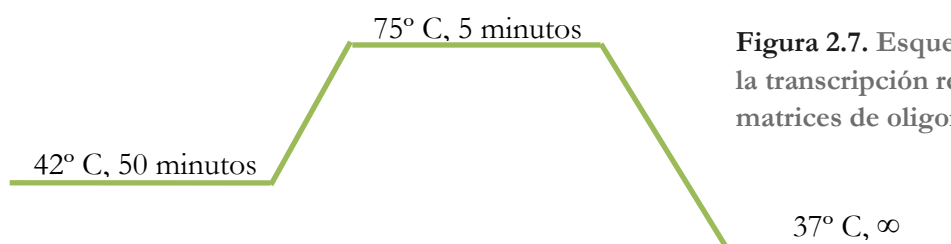


Figura 2.7. Esquema de reacción de la transcripción reversa (ensayo con matrices de oligonucleótidos).

2.8.2. Síntesis, marcaje y amplificación del ARNc.

Para esta fase se preparó la siguiente mezcla de reacción (**Tabla 2.13**).

| COMPONENTE | VOLUMEN (μl) POR REACCIÓN |
|-------------------------------|---------------------------|
| Tampón 2.5X de ARN polimerasa | 16 |
| Biotina-16-UTP 10 mM | 2 |
| Enzima ARN polimerasa | 2 |
| Volumen final | 20 |

Tabla 2.13. Mezcla de reacción para la síntesis, marcaje y amplificación del ARNc.

Esta mezcla de reacción se añadió y mezcló con los 20 μl anteriores, y se incubó durante toda una noche a 37° C, con el fin de aumentar así el rendimiento de la reacción.

2.8.3. Purificación del ARNc.

Transcurrido el tiempo de síntesis, marcaje y amplificación del ARNc, el producto de reacción se purificó con el kit SuperArray ArrayGrade™ cRNACleanup (SuperArray-Bioscience Corporation®, SABiosciences). Se añadieron inicialmente 50 μl de agua libre de ARNasas a cada una de las mezclas, hasta completar un volumen de 90 μl. El producto completo de la síntesis de ARNc se transfirió a un nuevo tubo estéril, y se incorporaron 315 μl de la Solución de lisis y unión, mezclando con ayuda de una pipeta. A continuación, se añadieron 315 μl de etanol absoluto, a temperatura ambiente, mezclando de nuevo adecuadamente con ayuda de una pipeta. Toda la mezcla se transfirió a una columna *Spin*, suministrada por el kit, y se centrifugó durante 30 segundos a 10000 rpm. El ARNc marcado quedó unido a la columna y se desechó el volumen eluido. A continuación, se cargaron en la columna 600 μl de la Solución de lavado con etanol y se realizó una centrifugación durante 30 segundos a 10000 rpm. Se descargó el volumen eluido y se realizó un segundo lavado con 200 μl de la solución anterior, centrifugando de nuevo durante 1 minuto a 13200 rpm.

El último paso consistió en eluir el ARNc de la columna, previa adición de 50 μl de la Solución libre de ARNasas Tris 10 mM pH 8.0. Se realizó a continuación una

incubación durante 2 minutos y se centrifugó la columna durante 1 minuto a 10000 rpm.

Finalmente, se procedió a cuantificar el ARNc y a determinar su calidad. Para cada una de las muestras seleccionadas en este ensayo, se diluyeron 4 µl de ARNc en 76 µl de agua libre de ARNasas.

La aplicación de la siguiente ecuación permitió determinar la concentración de ARNc (µg/µl):

$$\text{Concentración (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = (\text{DO}_{260} \times (40 \mu\text{g}/\text{ml} / \text{DO}_{260})) \times \text{Factor de dilución (20)} \times 1\text{ml}/1000 \mu\text{l}$$

La masa de ARNc marcada se determinó según la siguiente ecuación:

$$\text{Masa de ARNc marcado (}\mu\text{g)} = \text{Concentración (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} \times 50 \mu\text{l}$$

Se determinaron también las absorbancias a 260, 280 y 230 nm para con el fin de establecer la calidad del ARNc.

2.8.4. Hibridación.

Previamente a la hibridación de ARNc con las membranas de oligonucleótidos, se verificó su calidad, debiendo cumplir para su aceptación los siguientes requisitos: concentración superior a 11 ng/µl, $A_{260}/A_{280} \geq 2$ y $A_{260}/A_{230} \geq 1.7$.

Para todo el proceso de hibridación y detección quimioluminiscente se emplearon los reactivos incluidos en el kit GEArray™ Chemiluminescent Detection (SuperArray-Bioscience Corporation®, SABiosciences).

Antes de iniciar la hibridación, las membranas se activaron con 5 ml de agua ultra pura estéril, durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a la prehibridación de las membranas con 2 ml de la Solución de hibridación GEHyb, previamente calentada a 60° C. Cada membrana se situó en el interior de un cilindro de hibridación, y la prehibridación tuvo lugar durante 1-2 horas (hasta un máximo de 72 horas) a 60° C con rotación (5-10 rpm), en un horno de hibridación.

Tras la prehibidación, las membranas se hibridaron con el ARNc marcado (son necesarios al menos 2 μ g del ARNc marcado) diluido en 750 μ l de Solución de hibridación. La hibridación tuvo lugar a 60° C durante toda una noche, con rotación (5-10 rpm).

2.8.5. Lavados.

Transcurrido el tiempo de hibridación, la mezcla con la Solución de hibridación y el ARNc se almacenó en un tubo estéril a -20° C.

Las membranas se lavaron inicialmente con 5 ml de la Solución de lavado 1 (SSC 2X, SDS 1%), previamente calentada a 60° C, durante 15 minutos con rotación (20-30 rpm) y a 60° C. Finalizado el tiempo, se descargó la Solución de lavado 1 y se procedió a realizar un segundo lavado con 5 ml de la Solución de lavado 2 (SSC 0.1X, SDS 0.5%), también calentada previamente a 60° C, durante 15 minutos a la misma temperatura y con rotación (20-30 rpm). Transcurrido el tiempo indicado, la Solución de lavado 2 se desechó.

2.8.6. Detección quimioluminiscente.

A continuación, las membranas se incubaron con 2 ml de Solución de bloqueo Q, a temperatura ambiente, durante 40 minutos, con rotación (20-30 rpm).

Tras el bloqueo, se desechó la solución, y las membranas se incubaron con 2 ml de la Solución AP-SA (estreptavidina conjugada con la fosfatasa alcalina diluida en la Solución F 1X, 1:8000). La incubación se desarrolló durante 10 minutos con rotación (5-10 rpm), a temperatura ambiente.

Seguidamente, las membranas se lavaron 4 veces con 4 ml de la Solución F 1X, a temperatura ambiente con rotación suave. Cada lavado se desarrolló durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, las membranas se aclararon dos veces con 3 ml de la Solución G.

Finalmente, se procedió a realizar el revelado: las membranas se pusieron en contacto durante 2-3 minutos con 1 ml del sustrato *CDP-Star*, a temperatura ambiente, con rotación. Las membranas se autorradiografiaron para su posterior revelado y análisis.

Las membranas se escanearon con el programa informático Quantity one[®] (Bio-Rad). El análisis posterior se realizó con el *software* GEArray Expression Analysis Suite (SuperArray-Bioscience Corporation[®], SABiosciences). Los niveles de expresión se normalizaron con el gen *GAPDH* (Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa). El programa permitió determinar qué genes estaban expresados ± 2 veces entre los grupos en estudio. Se consideraron resultados significativos para valores de $P < 0.05$.

2.9. Ensayo de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

La PCR cuantitativa a tiempo real constituye una excelente herramienta para validar los resultados obtenidos del ensayo de expresión génica con matrices de oligonucleótidos. El estudio se desarrolló para aquellos genes que mostraron una elevada (≥ 6 veces de diferencia) y significativa sobre-expresión tras comparar el perfil de expresión génica de tumores no microcíticos de pulmón *vs.* tumores colorrectales, con acortamiento telomérico, en el ensayo con matrices de oligonucleótidos.

La PCR cuantitativa a tiempo real permite medir la acumulación de productos de PCR mediante el empleo de una sonda *fluorogénica* doblemente marcada (sonda TaqMan[®], Applied Biosystems, Foster City, California, Estados Unidos). El método proporciona una cuantificación precisa y reproducible de las copias de un gen (Heid *et al.*, 1996). La sonda TaqMan[®] posee en el extremo 5' un agente emisor de fluorescencia (FAMTM, 6-carboxi-fluoresceína) y un agente amortiguador de fluorescencia, no fluorescente, *minor groove binder* (MGB) *nonfluorescent quencher* (NFQ), en el extremo 3' (<http://www3.appliedbiosystems.com/>).

En una etapa inicial, **transcripción reversa**, se produce la síntesis del ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total. En la etapa de **PCR cuantitativa a tiempo real**, los productos de PCR son sintetizados a partir del ADNc, empleando una mezcla de reacción de PCR, en presencia de la sonda TaqMan MGB (6-FAM *dye-labeled*)[®], para detectar la secuencia de interés, y los cebadores, específicos para amplificar la secuencia de interés (<http://www3.appliedbiosystems.com/>).

Cuando la sonda está intacta, la proximidad entre el elemento emisor y el amortiguador resulta en la supresión de la emisión de fluorescencia (**Figura 2.8**, A y B). Al aprovechar la actividad nucleasa 5' \longrightarrow 3' de la ADN polimerasa, la sonda se rompe y libera el extremo con el elemento emisor de fluorescencia (**Figura 2.8**, C). Los fragmentos de sonda son desplazados del molde de ADN y la polimerización continúa. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere en el crecimiento exponencial (**Figura 2.8**, D), (<http://www3.appliedbiosystems.com/>).

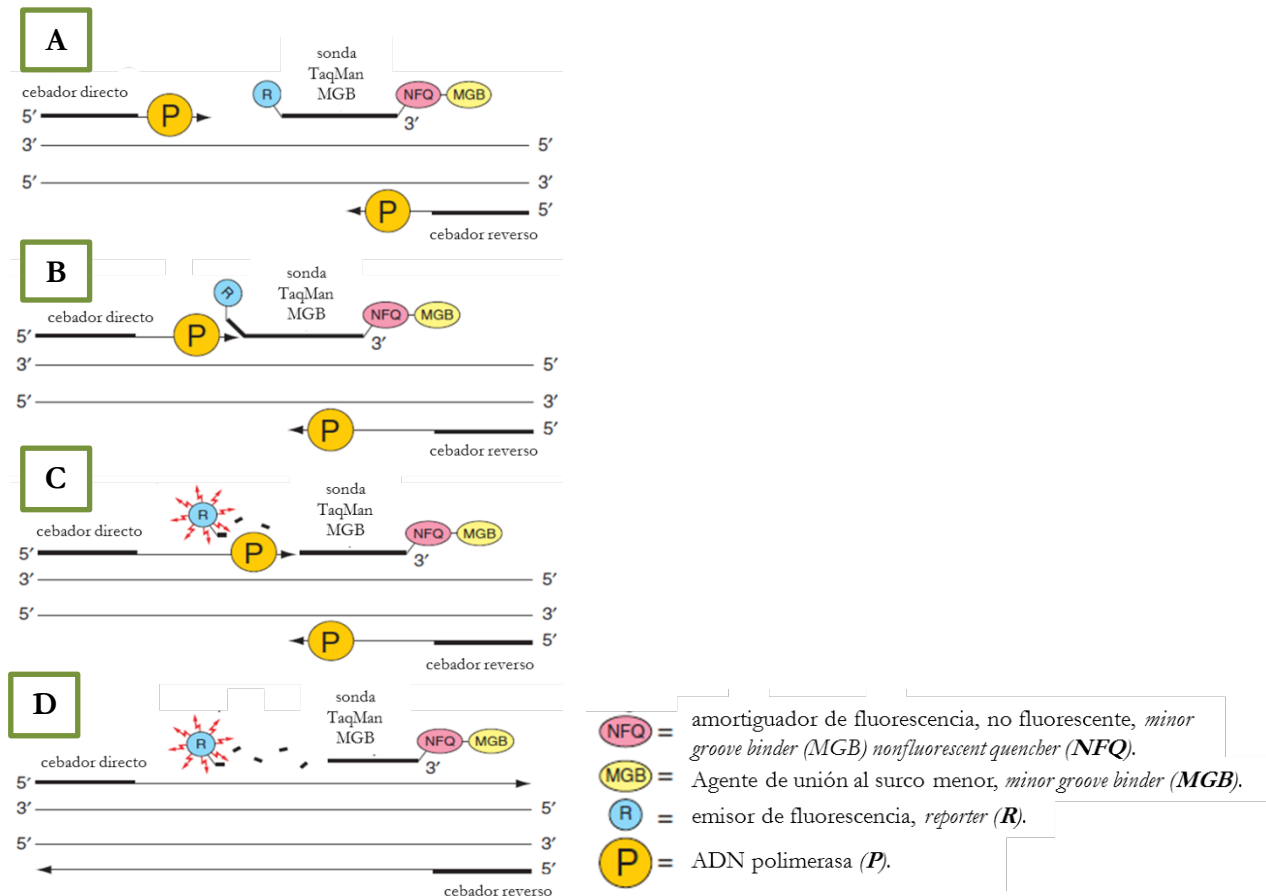


Figura 2.8. Representación esquemática de la PCR cuantitativa a tiempo real.
Adaptado de <http://www3.appliedbiosystems.com/>.

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los programas de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos (**Figura 2.9**). La cantidad de *amplión* producido es proporcional al número de moléculas de ARNm iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen, el *amplión* fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

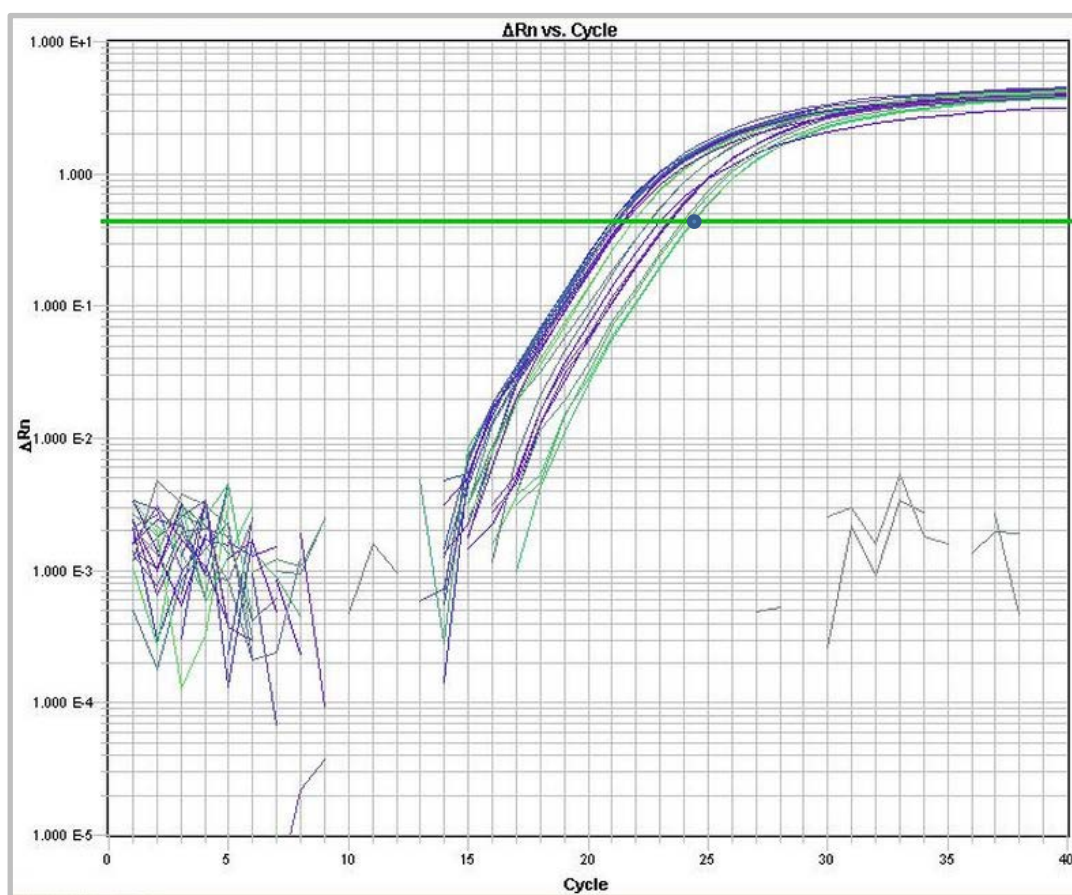


Figura 2.9. Gráfica de amplificación por PCR a tiempo real en escala logarítmica.

El eje vertical representa la cantidad de fluorescencia emitida, y el eje horizontal el número de ciclos. *Threshold* es el umbral en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia (— , en la figura) y el corte entre el *threshold* y la curva de amplificación determina el Ct (*cycle threshold* ●, en la figura) o ciclo umbral, que se emplea para la cuantificación. El cálculo del Ct siempre se realiza en la fase exponencial de la curva.

2.9.1. Síntesis del ADN complementario (ADNc), transcripción reversa.

Para la síntesis del ADNc se tomó el volumen correspondiente a 2 µg de ARN, completando hasta 50 µl con agua libre de nucleasas. A continuación, se preparó la mezcla de reacción 2X (Tabla 2.14) para la transcripción reversa (High-Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kits, Applied Biosystems), incorporando 50 µl al volumen anterior. Las condiciones para la transcripción reversa se detallan en la figura

(Figura 2.10). La concentración final obtenida de ADNc fue de 20 ng/ μ l en un volumen final de 100 μ l.

| COMPONENTE | VOLUMEN (μ l) POR REACCIÓN |
|--|---------------------------------|
| Tampón 10X de transcripción reversa | 10 |
| Mezcla 25X dNTPs | 4 |
| Mezcla 10X de cebadores que hibridan al azar | 10 |
| Enzima transcriptasa reversa (<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i> , 50 U/ μ l) | 5 |
| Inhibidor de ARNasas* | 2.5 |
| Agua libre de nucleasas | 18.5 |
| Volumen final | 50 |

Tabla 2.14. Mezcla de reacción para la transcripción reversa.

(*No incluido en el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcriptions Kits, Applied Biosystems; adquirido de forma independiente en Applied Biosystems).



Figura 2.10. Esquema de reacción de la transcripción reversa.

La amplificación de *GAPDH* a partir del ADNc sintetizado permite verificar el éxito de la reacción de transcripción reversa. Se desarrolló para ello una PCR convencional, empleando cebadores (Sigma Aldrich) exón-exón para *GAPDH* (Tabla 2.15), que no producen amplificaciones a partir del ADN genómico.

| CEBADOR | SECUENCIA | TAMAÑO DEL AMPLIFICADO |
|----------------------|--------------------------|------------------------|
| <i>GAPDH</i> directo | 5'-GATCATCAGCAATGCCTCCTG | ≈100 pb |
| <i>GAPDH</i> reverso | 5'-TGGCATGGACTGTGGTCATG | |

Tabla 2.15. Cebadores empleados para la amplificación de *GAPDH*.

La mezcla de reacción para la amplificación de *GAPDH* se detalla en la siguiente tabla (**Tabla 2.16**).

| COMPONENTE | VOLUMEN (μl) POR REACCIÓN |
|----------------------------------|---------------------------|
| Tampón 10X sin MgCl ₂ | 5 |
| MgCl ₂ 25 mM | 2 |
| Mezcla 10 mM dNTPs | 1 |
| ADN polimerasa 5 U/μl | 0.25 |
| Cebador directo 10 μM | 1 |
| Cebador reverso 10 μM | 1 |
| ADNc | 1 |
| Agua libre de nucleasas | 38.75 |
| Volumen final | 50 |

Tabla 2.16. Mezcla de reacción para la PCR de *GAPDH*.

A continuación se detallan las condiciones para la PCR (**Tabla 2.17**).

| TIEMPO | TEMPERATURA (° C) | NÚMERO DE CICLOS |
|-------------|-------------------|------------------|
| 2 minutos | 94 | 1 |
| 30 segundos | 94 | 40 |
| 30 segundos | 55 | |
| 90 segundos | 72 | |
| 10 minutos | 72 | 1 |
| ∞ | 4 | ∞ |

Tabla 2.17. Condiciones para la PCR de *GAPDH*.

La banda amplificada se identificó en un gel de agarosa al 2%, con TBE 1X, suplementado con bromuro de etidio (1 mg/ml) y tampón de carga 1X (composición detallada en “Extracción y valoración de ARN”), con ayuda del marcador de peso molecular HyperLadder™ V (Bioline, Londres, Reino Unido).

2.9.2. PCR cuantitativa a tiempo real.

Para el desarrollo de la PCR cuantitativa a tiempo real se preparó la siguiente mezcla de reacción (**Tabla 2.18**).

| COMPONENTE | VOLUMEN (μl) POR REACCIÓN |
|---|---------------------------|
| <i>TaqMan® Gene Expression Assay 20X*</i> | 1 |
| <i>TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X, No AmpErase® UNG#</i> | 10 |
| Agua libre de nucleasas | 8 |
| ADNc (20 ng/μl) | 1 |
| Volumen final | 20 |

Tabla 2.18. Mezcla de reacción para la PCR cuantitativa a tiempo real.
(*Y #, Applied Biosystems).

El componente *TaqMan® Gene Expression Assay 20X* incluye dos cebadores no marcados, para amplificar la secuencia de interés, y la sonda *TaqMan MGB (6-FAM dye-labeled)®*, para detectar la secuencia de interés. La mezcla de reacción, *TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X, No AmpErase® UNG* incluye la ADN polimerasa *AmpliTaq Gold® DNA polymerase*, así como el resto de componentes que aseguran una amplificación fiable y precisa de la secuencia objeto de estudio.

Las amplificaciones de cada muestra para las secuencias objeto de estudio se realizaron por duplicado, en placas de 96 pocillos (*MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode*, Applied Biosystems). Se empleó como control negativo la mezcla de reacción antes descrita, sin ADNc. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. A continuación se detalla el programa empleado para la amplificación mediante PCR cuantitativa a tiempo real (**Tabla 2.19**), desarrollado en el ABI Prism 7700 (Applied Biosystems).

| FASE | TIEMPO | TEMPERATURA (° C) | NÚMERO DE CICLOS |
|------------------------|-------------|----------------------|---------------------|
| Desnaturalización | 20 segundos | 95 | 1 |
| Amplificación | | | |
| Desnaturalización | 1 segundo | 95 | 40 |
| Hibridación/Elongación | 20 segundos | 60 | |

Tabla 2.19. Condiciones para la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real.

El análisis de la PCR cuantitativa a tiempo real se basó en el método comparativo del Ct (*cycle threshold*):

El valor de expresión del gen objeto de estudio en cada muestra (Ct muestra) se comparó con el valor de Ct de dicho gen en la muestra calibradora (Ct calibrador). En este trabajo consistió en una mezcla de muestras no tumorales, para cada caso, de epitelio colorrectal y epitelio pulmonar, no tumoral. Los niveles de expresión de cada gen en la muestra tumoral y en el calibrador fueron normalizados respecto al valor de Ct de *GAPDH* (Ct endógeno), empleado también para la normalización en el ensayo de expresión con matrices de oligonucleótidos.

Así pues, las ecuaciones empleadas para determinar el nivel de expresión del gen objeto de estudio en cada muestra, fueron las siguientes:

$$\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{endógeno}} ; \Delta Ct_{\text{calibrador}} = Ct_{\text{calibrador}} - Ct_{\text{endógeno}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}} ; RQ^* = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

* El valor de RQ (*relative quantification*) del calibrador es 1. Valores de RQ comprendidos entre 0.5 y 2 implican que el nivel de expresión del gen objeto de estudio en la muestra tumoral es similar al nivel de expresión de dicho gen en el calibrador. Valores de RQ > 2 suponen una sobre-expresión del gen objeto de estudio en la muestra tumoral, respecto al calibrador. Valores de RQ < 0.5 implican una expresión disminuida del gen objeto de estudio en la muestra tumoral, respecto al calibrador.

2.10. Estadística.

Para los análisis estadísticos se empleó el programa IBM SPSS (*Statistical Package for social science*) Statistics 19.

Para evaluar la asociación entre una variable categórica (o nominal) y una variable cuantitativa, se analizaron y compararon las medias de la distribución de la variable cuantitativa en cada uno de los grupos que forman la variable categórica. Si la variable categórica es dicotómica, la comparación de medias entre dos grupos se llevó a cabo por el test t de Student. Si tiene tres o más categorías, la comparación de medias entre tres o más grupos se realizó a través del modelo matemático Análisis de la Varianza (ANOVA de una vía). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas si $P < 0.05$. En ambos casos, las pruebas estadísticas son exigentes con ciertos requisitos previos: la distribución normal de la variable cuantitativa en los grupos que se comparan y la homogeneidad de varianzas en las poblaciones de las que proceden los grupos; su incumplimiento conlleva la necesidad de recurrir a pruebas estadísticas no paramétricas (U de Mann-Whitney y Kruskal Wallis). La prueba de rangos de Wilcoxon se empleó como alternativa no paramétrica a la prueba T, utilizada para comprobar la significación de la diferencia de medias entre dos muestras relacionadas (<http://www.fabis.org/>).

Para identificar relaciones de dependencia entre variables cualitativas se utilizó un contraste estadístico basado en el test de la Chi-cuadrado (χ^2) asumiendo relación de dependencia entre variables si $P < 0.05$.

Para evaluar el grado de asociación o independencia de dos variables cuantitativas se recurrió a las técnicas de correlación y/o regresión. En el caso de incumplirse la condición de normalidad en las variables evaluadas se optó por la alternativa no paramétrica correspondiente: el coeficiente de correlación de Pearson es el paramétrico y el de Spearman, el no paramétrico. En términos generales, aceptamos que, si el coeficiente de correlación (r) (sea o no paramétrico) es inferior a 0.3, la asociación es débil. Si r está comprendido entre 0.3 y 0.7, la asociación es moderada. Y, si r es superior a 0.7, la asociación es fuerte (<http://www.fabis.org/>).

El método de Kaplan-Meier fue el procedimiento elegido para estimar las curvas de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad¹⁹, y el test Log-Rank para compararlas entre sí. Los estudios de supervivencia sólo incluyen a los pacientes sometidos a cirugía potencialmente curativa. Así pues, únicamente se consideró a los

¹⁹ ILE, tiempo transcurrido entre la resección quirúrgica y la recidiva tumoral.

pacientes que habían desarrollado tumores colorrectales clasificados en los estadios A, B o C, y los pacientes con tumores no microcíticos de pulmón I, II o IIIA. Se excluyeron de los análisis de supervivencia los pacientes que habían fallecido en el periodo post-operatorio. Se consideraron en estos análisis a los pacientes para los que se disponía del dato referente a la longitud telomérica media en la muestra tumoral, y del dato referente a la actividad telomerasa, según cada caso. Se consideró un tiempo de seguimiento de sesenta meses para las curvas de supervivencia. Se definieron como datos censurados, los referentes a los pacientes que no habían recidivado en la fecha de finalización del estudio, o bien aquellos con los que se había perdido el contacto en un instante determinado. La aplicación electrónica *Cutoff Finder* (Budczies *et al.*, 2012) nos permitió identificar el punto de corte óptimo en relación al estatus telomérico que establece dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico.

3. Resultados

3.1. Estudio de la función telomérica en los tumores no microcíticos de pulmón y su relación con las variables clínico-patológicas. Estudios de pronóstico.

3.1.1. La longitud telomérica y la actividad telomerasa.

La **longitud telomérica** se obtuvo para un total de 56 muestras tumorales de los 68 pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP), y para sus correspondientes muestras de tejido control. Nótese que la obtención de ADN degradado, o en condiciones subóptimas, limita el uso de algunas muestras para el protocolo de medida de la longitud de los fragmentos teloméricos, por ello no se dispuso de esta información para toda la población.

Para las muestras de tumores no microcíticos de pulmón, la longitud media telomérica (media \pm error estándar) fue 4.51 ± 0.33 Kb y 5.44 ± 0.32 Kb, para las muestras no tumorales. La longitud telomérica media entre ambos grupos es significativamente diferente ($P < 0.001$; prueba t de Student), (**Figura 3.1**).

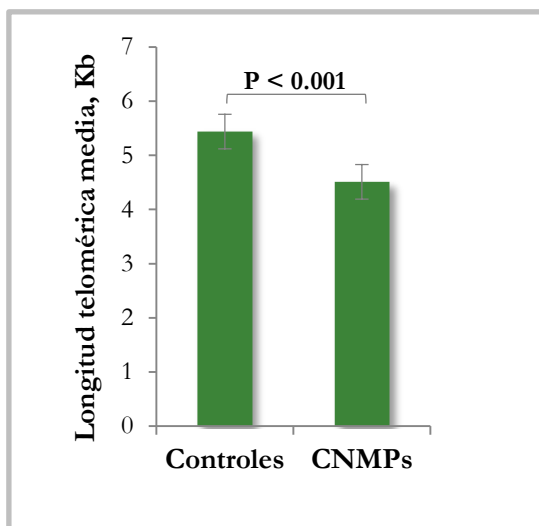


Figura 3.1. La longitud telomérica en las muestras de CNMP y en los controles.

Además, puede afirmarse que existe una fuerte correlación lineal entre la longitud telomérica de las muestras de cáncer no microcítico de pulmón y la longitud telomérica de las muestras control (correlación de Pearson = 0.862; P valor asociado < 0.001), (**Figura 3.2**).

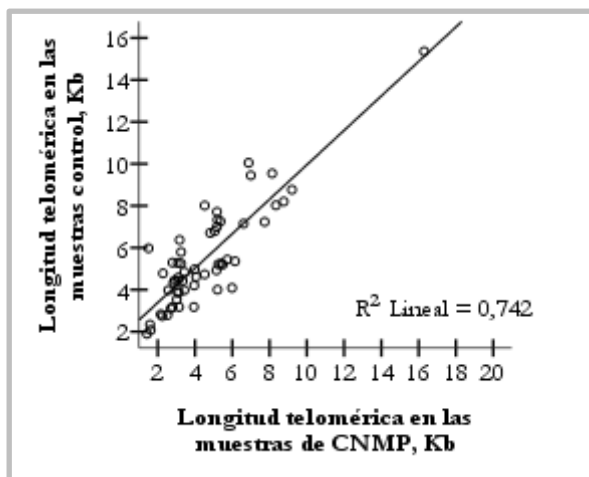


Figura 3.2. Diagrama de dispersión para las longitudes teloméricas (Kb) en las muestras de CNMP y controles.

La longitud telomérica media de cada pareja de muestras tumoral (TRF T, *Telomere Restriction Fragments Tumor*) y control, no tumoral (TRF N, *Telomere Restriction Fragments Normal*), permite calcular el ratio TRF T/TRF N. El valor medio del ratio TRF T/TRF N (media \pm error estándar) fue 0.83 ± 0.029 . La **Figura 3.3** representa un ejemplo de los resultados obtenidos para la medida de la longitud de los fragmentos teloméricos, en cinco parejas de muestras (tumores no microcíticos de pulmón y su correspondientes muestras control).

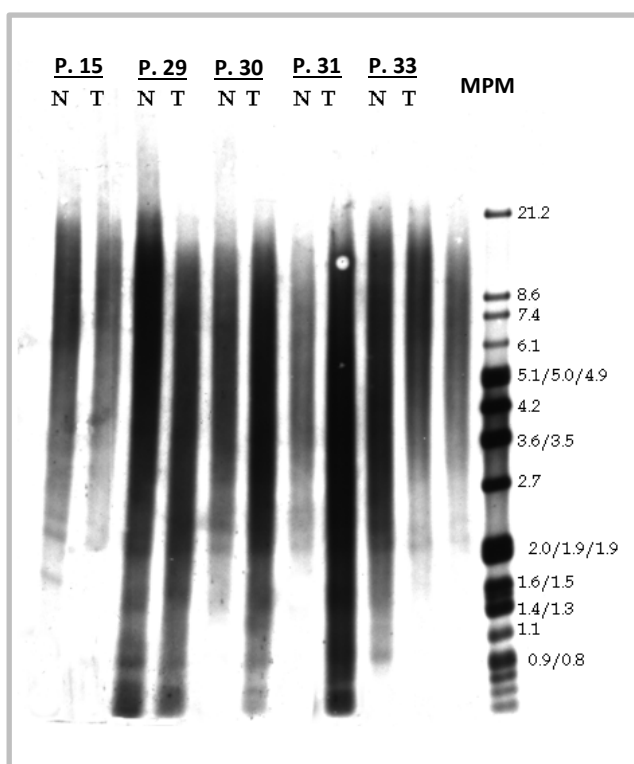


Figura 3.3. Resultado de la hibridación con la sonda complementaria a las repeticiones teloméricas por *Southern-blot*. Se muestra: en el extremo derecho, el marcador de peso molecular (MPM) empleado para determinar la longitud de los telómeros de las distintas muestras, con sus correspondientes valores de peso molecular expresados en Kb. P: paciente; N: muestra control; T: muestra tumoral; C1: control de alto peso molecular.

En relación a la **actividad telomerasa**, y de acuerdo a los criterios establecidos en el protocolo “Determinación de la actividad telomerasa”, se detectó actividad telomerasa positiva en 61 tumores (89.7% de los casos). En 7 muestras tumorales (10.3%) no se detectó actividad telomerasa (definido como actividad telomerasa negativa). No existen diferencias estadísticamente significativas entre la longitud telomérica media para las muestras de CNMP con actividad telomerasa positiva *vs.* el grupo con actividad telomerasa negativa ($P = 0.620$; prueba U de Mann-Whitney), (**Tabla 3.1**).

| ACTIVIDAD TELOMERASA | Nº DE CASOS | LONGITUD TELOMÉRICA (Kb), EN CNMPs (media \pm EE) | P |
|-------------------------|----------------|--|-------|
| POSITIVA | 49 | 4.27 \pm 0.27 | 0.620 |
| NEGATIVA | 7 | 6.18 \pm 1.90 | |

Tabla 3.1. La actividad telomerasa y la longitud telomérica en los CNMPs (para los 56 casos de los que se dispuso de la información de longitud telomérica media); EE: error estándar.

En cuanto al valor del ratio TRF T/TRF N, para el grupo de tumores con actividad telomerasa positiva fue 0.84 ± 0.03 (media \pm error estándar), y para el grupo de tumores con actividad telomerasa negativa, 0.77 ± 0.1 (media \pm error estándar).

3.1.2. La longitud telomérica y su relación con las variables clínico-patológicas.

A continuación, se procedió a analizar la posible asociación existente entre la longitud telomérica, en las muestras de CNMP, y las variables clínico-patológicas de los cánceres objeto de estudio (**Tabla 3.2**).

| VARIABLE | Nº DE CASOS | LONGITUD TELOMÉRICA (Kb), EN CNMPs (media \pm EE) | P Y PRUEBA ESTADÍSTICA |
|--|-------------|---|------------------------------|
| ESTADIO | 56 | | |
| IA, IB | 40 | 4.45 \pm 0.33 | P = 0.500; Kruskal-Wallis |
| IIA, IIB | 2 | 3.38 \pm 1.13 | |
| IIIA | 9 | 3.69 \pm 0.48 | |
| IIIB | 3 | 4.54 \pm 0.64 | |
| IV | 2 | 10.40 \pm 5.88 | |
| T, tumor primario | 56 | | |
| T1 | 15 | 4.58 \pm 0.47 | P = 0.482; Kruskal-Wallis |
| T2 | 32 | 4.14 \pm 0.38 | |
| T3 | 5 | 6.66 \pm 2.45 | |
| T4 | 4 | 4.53 \pm 0.45 | |
| N, invasión a los ganglios linfáticos | 56 | | |
| N0 | 45 | 4.68 \pm 0.40 | P = 0.801; Kruskal-Wallis |
| N1 | 2 | 3.38 \pm 1.13 | |
| N2 | 8 | 4.00 \pm 0.56 | |
| N3 | 1 | ----- | |
| TIPO HISTOLÓGICO | 55 | | |
| Carcinoma epidermoide o de células escamosas | 29 | 4.30 \pm 0.36 | P = 0.172; Kruskal-Wallis |
| Adenocarcinoma | 23 | 4.92 \pm 0.64 | |
| Carcinoma indiferenciado de célula grande | 3 | 2.54 \pm 0.51 | |

Tabla 3.2. La longitud telomérica en los CNMPs y su relación con las variables clínico-patológicas. EE: error estándar.

A la vista de los resultados obtenidos, y expuestos en la tabla anterior (**Tabla 3.2**), podemos concluir que no hemos encontrado argumentos para relacionar la longitud telomérica con las variables clínico-patológicas evaluadas, en esta población objeto de estudio.

El cociente TRF T/TRF N resulta ilustrativo para conocer el grado de acortamiento telomérico en la muestra tumoral respecto a su control. En la siguiente tabla (**Tabla 3.3**) se detalla el análisis efectuado para conocer la posible asociación entre este cociente y las variables clínico-patológicas.

| VARIABLE | Nº DE CASOS | TRF T/TRF N (media \pm EE) | P Y PRUEBA ESTADÍSTICA |
|--|-------------|---------------------------------|----------------------------------|
| ESTADIO | 56 | | |
| IA, IB | 40 | 0.84 \pm 0.04 | P = 0.844; ANOVA de un factor |
| IIA, IIB | 2 | 0.89 \pm 0.07 | |
| IIIA | 9 | 0.81 \pm 0.05 | |
| IIIB | 3 | 0.70 \pm 0.04 | |
| IV | 2 | 0.81 \pm 0.25 | |
| T, tumor primario | 56 | | |
| T1 | 15 | 0.87 \pm 0.04 | P = 0.420; ANOVA de un factor |
| T2 | 32 | 0.83 \pm 0.04 | |
| T3 | 5 | 0.85 \pm 0.08 | |
| T4 | 4 | 0.66 \pm 0.04 | |
| N, invasión a los ganglios linfáticos | 56 | | |
| N0 | 45 | 0.83 \pm 0.03 | P = 0.790; ANOVA de un factor |
| N1 | 2 | 0.89 \pm 0.07 | |
| N2 | 8 | 0.83 \pm 0.05 | |
| N3 | 1 | ----- | |
| TIPO HISTOLÓGICO | 55 | | |
| Carcinoma epidermoide o de células escamosas | 29 | 0.80 \pm 0.04 | P = 0.028; Kruskal-Wallis |
| Adenocarcinoma | 23 | 0.91 \pm 0.04 | |
| Carcinoma indiferenciado de célula grande | 3 | 0.56 \pm 0.17 | |

Tabla 3.3. Ratio de acortamiento telomérico y su relación con las variables clínico-patológicas. EE: error estándar.

Considerando los resultados expuestos en la tabla anterior (**Tabla 3.3**), podemos afirmar que el ratio medio de acortamiento telomérico entre los grupos histológicos establecidos es significativamente diferente (P = 0.028; Kruskal-Wallis). Así pues, el acortamiento telomérico, respecto al tejido control, fue más acusado en los carcinomas indiferenciados de célula grande, cuyo ratio medio TRF T/TRF N (media \pm

error estándar) fue 0.56 ± 0.17 . Para el resto de las variables clínico-patológicas, el ratio medio TRF T/TRF N fue similar entre los diferentes grupos analizados.

3.1.3. La actividad telomerasa y su relación con las variables clínico-patológicas.

Los resultados correspondientes al análisis de la existencia de una posible relación de dependencia entre la actividad telomerasa, en la población de CNMPs y las variables clínico-patológicas, se detallan en la siguiente tabla (**Tabla 3.4**). Los resultados obtenidos revelan que la actividad telomerasa no se asocia con ninguna de las variables clínico-patológicas evaluadas en la población analizada.

| VARIABLE | Nº DE CASOS | ACTIVIDAD TELOMERASA | | P; χ^2 |
|--|-------------|----------------------|----------|-------------|
| | | NEGATIVA | POSITIVA | |
| ESTADIO | 68 | | | |
| IA, IB | 49 | 5 | 44 | 0.150 |
| IIA, IIB | 4 | 0 | 4 | |
| IIIA | 10 | 0 | 10 | |
| IIIB | 3 | 1 | 2 | |
| IV | 2 | 1 | 1 | |
| T, tumor primario | 68 | | | |
| T1 | 18 | 2 | 16 | 0.670 |
| T2 | 40 | 3 | 37 | |
| T3 | 6 | 1 | 5 | |
| T4 | 4 | 1 | 3 | |
| N, invasión a los ganglios linfáticos | 68 | | | |
| N0 | 55 | 6 | 49 | 0.922 |
| N1 | 3 | 0 | 3 | |
| N2 | 9 | 1 | 8 | |
| N3 | 1 | 0 | 1 | |
| TIPO HISTOLÓGICO | 67 | | | |
| Carcinoma epidermoide o de células escamosas | 34 | 2 | 32 | 0.422 |
| Adenocarcinoma | 29 | 3 | 26 | |
| Carcinoma indiferenciado de célula grande | 4 | 1 | 3 | |

Tabla 3.4. La actividad telomerasa en los CNMPs y su relación con las variables clínico-patológicas.

3.1.4. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (I).

El manejo de un tamaño muestral insuficiente puede obviar la detección de diferencias en el pronóstico clínico entre grupos de pacientes. Por ello, la información relativa a las variables clínico-patológicas, y de función telomérica, de los 68 pacientes afectados de CNMP considerados en esta Tesis, se incorporó a la base de datos de 135 pacientes afectados de CNMP, disponible en nuestro grupo de investigación, logrando así una población con un total de 203 pacientes. De igual modo, las muestras se obtuvieron de pacientes enfermos de cáncer no microcítico de pulmón, e intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo y Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. En todos los casos se dispuso de una muestra de tejido tumoral y no tumoral del mismo paciente, esta última tomada al menos a 10 cm de distancia del margen del tumor.

A continuación, se muestra una tabla (**Tabla 3.5**) en la que se recogen las características clínico-patológicas de la población incluida en los estudios de pronóstico.

| VARIABLE | | NÚMERO DE CASOS |
|--|--|-----------------|
| SEXO¹ | | 202 |
| | Femenino | 20 |
| | Masculino | 182 |
| EDAD¹ | | 177 |
| | 65 ≤ años | 90 |
| | 65 > años | 87 |
| ESTADIO¹ | | 201 |
| | I | 114 |
| | II | 12 |
| | IIIA | 55 |
| | IIIB | 14 |
| | IV | 6 |
| TIPO HISTOLÓGICO¹ | | 200 |
| | Carcinoma epidermoide o de células escamosas | 109 |
| | Adenocarcinoma | 80 |
| | Carcinoma indiferenciado de célula grande | 11 |
| T¹, tumor primario | | 200 |
| | T1 | 29 |
| | T2 | 122 |
| | T3 | 33 |
| | T4 | 16 |
| N¹, diseminación a los ganglios linfáticos | | 201 |
| | N0 | 139 |
| | N1 | 18 |
| | N2 | 43 |
| | N3 | 1 |
| M¹, metástasis | | 201 |
| | M0 | 195 |
| | M1 | 6 |
| RECURRENCIA¹ | | 192 |
| | NO | 132 |
| | SÍ | 60 |

Tabla 3.5. Características clínico-patológicas de los cánceres no microcíticos de pulmón, de la población considerada en los estudios de pronóstico. ¹Para el sexo de los pacientes, la edad, el estadio, el tipo histológico, los descriptores T, N y M, y la recurrencia en el proceso tumoral, no se dispuso de la información para 1, 26, 2, 3, 3, 2, 2 y 11 casos, respectivamente.

La longitud media telomérica (media \pm error estándar) para las muestras de tumores no microcíticos de pulmón fue 6.55 ± 0.26 Kb y 6.99 ± 0.19 Kb, para las muestras control. La longitud telomérica media entre ambos grupos es significativamente diferente ($P = 0.027$; prueba t de Student). También se detectó una correlación lineal entre la longitud telomérica de las muestras de cáncer no microcítico de pulmón y la longitud telomérica de las muestras no tumorales (correlación de Pearson = 0.668; P valor asociado < 0.001), (**Figura 3.4**). El valor medio del ratio TRF T/TRF N (media \pm error estándar) fue 0.93 ± 0.026 .

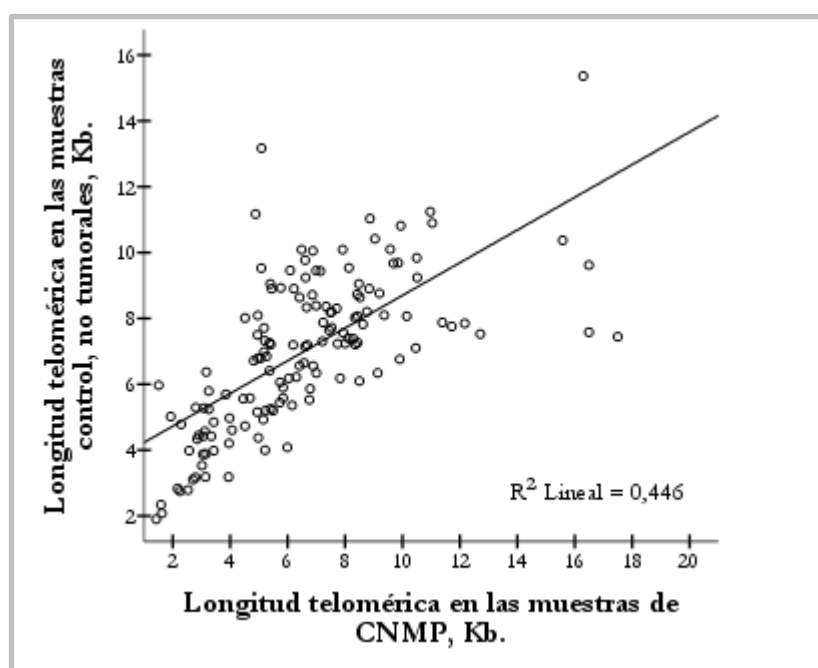


Figura 3.4. Diagrama de dispersión para las longitudes teloméricas (Kb) en las muestras de CNMP y controles.

En relación a la actividad telomerasa, se detectó actividad positiva en 151 tumores (84.8%). En 27 muestras tumorales (15.2%) no se detectó actividad telomerasa (definido como actividad telomerasa negativa)²⁰. No existen diferencias estadísticamente significativas entre la longitud telomérica media para las muestras de CNMP con actividad telomerasa positiva (6.47 ± 0.27 Kb) *vs.* el grupo con actividad telomerasa negativa (7.05 ± 0.84 Kb), ($P = 0.665$; prueba U de Mann-Whitney). En cuanto al valor del ratio TRF T/TRF N, para el grupo de tumores con actividad telomerasa positiva fue 0.94 ± 0.028 (media \pm error estándar), y para el grupo de tumores sin actividad telomerasa, 0.89 ± 0.06 (media \pm error estándar).

²⁰ Información no disponible para 25 casos.

Esta población de pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón se estratificó en dos grupos, con el fin de explorar si **la longitud telomérica** puede constituir un **posible biomarcador con valor pronóstico, en el proceso tumoral**. La aplicación electrónica *Cutoff Finder* (Budczies *et al.*, 2012) nos permitió identificar el punto de corte óptimo para la longitud telomérica que establece dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico. El método de Kaplan-Meier fue el procedimiento elegido para estimar las curvas de supervivencia, y el test Log-Rank para compararlas entre sí.

En total formaron parte de este estudio 125 pacientes. El punto de corte óptimo que discrimina entre las dos subpoblaciones con un pronóstico clínico significativamente diferente se sitúa en 7.29 Kb ($P = 0.034$; Log-Rank), (**Figura 3.5**). Ochenta pacientes (80/125; 64%) presentaron una longitud telomérica media en la muestra tumoral inferior a 7.29 Kb; treinta y dos de ellos (32/80; 40%) recurrieron en el proceso tumoral y 48 (48/80; 60%) fueron catalogados como datos censurados. Cuarenta y cinco pacientes (45/125; 36%) mostraron una longitud telomérica media en la muestra tumoral superior a 7.29 Kb; tan sólo 9 de ellos (9/45; 20%) recidivaron, y treinta y seis pacientes (36/45; 80%) se clasificaron como censurados.

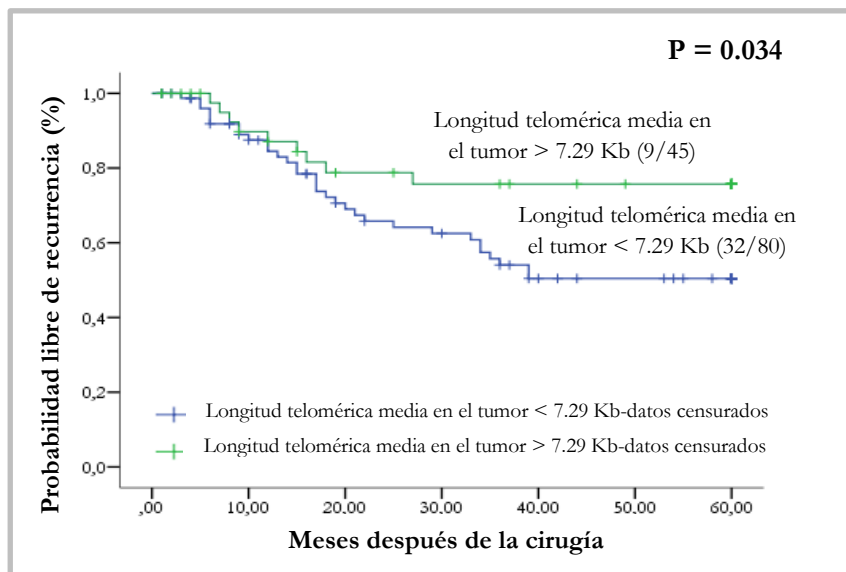


Figura 3.5. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando la longitud telomérica media en los CNMPs. Entre paréntesis se detalla el nº de pacientes que recurren en el proceso tumoral/nº total de casos.

El intervalo libre de enfermedad medio para los pacientes con una longitud telomérica media en la muestra tumoral inferior a 7.29 Kb fue de 39.91 ± 2.68 meses (media \pm error estándar); y para los pacientes incluidos en el otro grupo (longitud telomérica media en la muestra tumoral superior a 7.29 Kb), fue de 48.70 ± 3.31 meses (media \pm error estándar). Así pues, la longitud telomérica media en los tumores no microcíticos de pulmón parece influir de manera significativa en el pronóstico clínico de los pacientes afectados ($P = 0.034$; Log-Rank).

Al aplicar el análisis multivariante de Cox se constató que una longitud telomérica media en el tumor inferior a 7.29 Kb, constituía un parámetro de pronóstico adverso independiente a otras variables clínico-patológicas. La elección de las variables que formaron parte de este análisis se realizó a partir de un análisis univariable, considerando el estadio tumoral y la diseminación a los ganglios linfáticos, puesto que fueron las dos únicas variables clínico-patológicas con un nivel de significación inferior a 0.05.

Las variables estadio y diseminación a los ganglios linfáticos resultaron ser covariables linealmente dependientes o constantes, por ello el análisis multivariante se particularizó para la longitud telomérica media tumoral *vs.* estadio y longitud telomérica media tumoral *vs.* diseminación del tumor a los ganglios linfáticos (**Tabla 3.6 y Tabla 3.7**).

| VARIABLE | RIESGO RELATIVO | P |
|---|-----------------|-------|
| LONGITUD TELOMÉRICA MEDIA EN EL TUMOR < 7.29 Kb | 2.70 | 0.010 |
| ESTADIO, I <i>vs.</i> II o IIIa | 0.34 | 0.002 |

Tabla 3.6. Análisis multivariante de Cox considerando la longitud telomérica y el estadio, en los cánceres no microcíticos de pulmón.

| VARIABLE | RIESGO RELATIVO | P |
|---|-----------------|-------|
| LONGITUD TELOMÉRICA MEDIA EN EL TUMOR < 7.29 Kb | 2.26 | 0.032 |
| N, diseminación a los ganglios linfáticos (N0 <i>vs.</i> N1 o N2) | 0.41 | 0.021 |

Tabla 3.7. Análisis multivariante de Cox considerando la longitud telomérica y la diseminación del tumor a los ganglios, en los cánceres no microcíticos de pulmón.

El **ratio de acortamiento telomérico también fue considerado para la realización de un estudio de supervivencia**, de nuevo medida como intervalo libre de enfermedad. En este caso, el punto de corte óptimo que nos permitió identificar dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico se sitúa en 0.97 ($P = 0.040$; Log-Rank), (**Figura 3.6**). El intervalo libre de enfermedad medio para los pacientes con un ratio medio TRF T/TRF N inferior a 0.97²¹ fue de 39.32 ± 2.89 meses (media \pm error estándar); y para los pacientes incluidos en el otro grupo (ratio medio TRF T/TRF N superior a 0.97²²), fue de 48.25 ± 2.96 meses (media \pm error estándar).

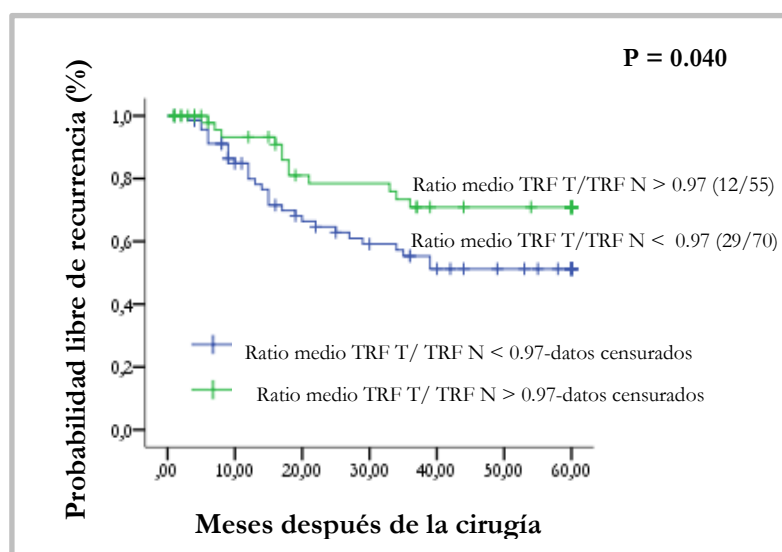


Figura 3.6. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando el ratio medio TRF T/TRF N. Entre paréntesis se detalla el nº de pacientes que recurren en el proceso tumoral/nº total de casos.

En total formaron parte de este estudio 125 pacientes. Setenta (70/125; 56%) presentaron un ratio medio TRF T/TRF N inferior a 0.97; veintinueve de ellos (29/70; 41.43 %) recurrieron en el proceso tumoral, y cuarenta y uno (41/70; 58.57%) fueron catalogados como datos censurados. Cincuenta y cinco pacientes (55/125; 44%) fueron incluidos en el grupo con un ratio medio TRF T/TRF N superior a 0.97; doce (12/55; 21.82%) de ellos recidivaron en el proceso tumoral y cuarenta y tres (43/55; 78.18%) se clasificaron como censurados. El análisis multivariante de Cox verifica

²¹ Longitud telomérica media tumoral: 5.08 ± 0.26 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 6.80 ± 0.30 Kb.

²² Longitud telomérica media tumoral: 8.43 ± 0.41 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 7.01 ± 0.24 Kb.

que un ratio medio TRF T/TRF N inferior a 0.97 constituye un factor de pronóstico desfavorable, independiente del estadio tumoral y del grado de diseminación del tumor a los ganglios linfáticos.

Como las variables estadio y diseminación a los ganglios linfáticos resultaron ser linealmente dependientes o constantes, el análisis multivariante se particularizó para la longitud telomérica media tumoral *vs.* estadio y longitud telomérica media tumoral *vs.* diseminación del tumor a los ganglios linfáticos (Tabla 3.8 y Tabla 3.9).

| VARIABLE | RIESGO RELATIVO | P |
|---------------------------------|-----------------|-------|
| RATIO MEDIO TRF T/TRF N < 0.97 | 2.02 | 0.041 |
| ESTADIO, I <i>vs.</i> II o IIIa | 0.42 | 0.010 |

Tabla 3.8. Análisis multivariante de Cox considerando la longitud telomérica y el estadio, en los cánceres no microcíticos de pulmón.

| VARIABLE | RIESGO RELATIVO | P |
|---|-----------------|-------|
| RATIO MEDIO TRF T/TRF N < 0.97 | 1.93 | 0.058 |
| N, diseminación a los ganglios linfáticos (N0 <i>vs.</i> N1 o N2) | 0.44 | 0.036 |

Tabla 3.9. Análisis multivariante de Cox considerando la longitud telomérica y la diseminación del tumor a los ganglios, en los cánceres no microcíticos de pulmón.

También fue investigado en esta Tesis la **implicación de la actividad telomerasa en el pronóstico clínico** de los pacientes. En total formaron parte de este estudio 147 pacientes. En ciento veintinueve (129/147; 87.76%) de las muestras tumorales se detectó actividad telomerasa, y dieciocho (18/147; 12.24%) fueron clasificadas en el grupo con actividad telomerasa negativa. Tan solo uno de los pacientes (1/18; 5.56%) en cuya muestra tumoral no se detectó actividad telomerasa, recidivó durante el periodo de seguimiento de la serie. Los diecisiete (17/18; 94.44%) restantes se catalogaron en el grupo de censurados. En cuanto a los pacientes en cuya muestra tumoral sí se detectó actividad telomerasa, cuarenta y dos (42/129; 32.56%) de ellos recurrieron en el proceso tumoral, y los ochenta y siete (87/129; 67.44%) restantes se incluyeron en el grupo de censurados. El intervalo medio libre de enfermedad para los pacientes en cuya muestra tumoral no se detectó actividad telomerasa fue de 58 ± 1.92 meses (media \pm error estándar); sin embargo, para los sujetos en los que sí se detectó actividad telomerasa en el tumor, fue de 43.29 ± 2.09 meses (media \pm error

estándar). El test Log-Rank, mediante el que se compararon las curvas de supervivencia de ambos grupos, reveló la existencia de diferencias significativas en cuanto al intervalo medio libre de enfermedad ($P = 0.028$; Log-Rank), (**Figura 3.7**). Sin embargo, la actividad telomerasa no puede ser considerada un factor pronóstico independiente en el carcinoma no microcítico de pulmón, como reveló el análisis multivariante de Cox ($P = 0.069$).

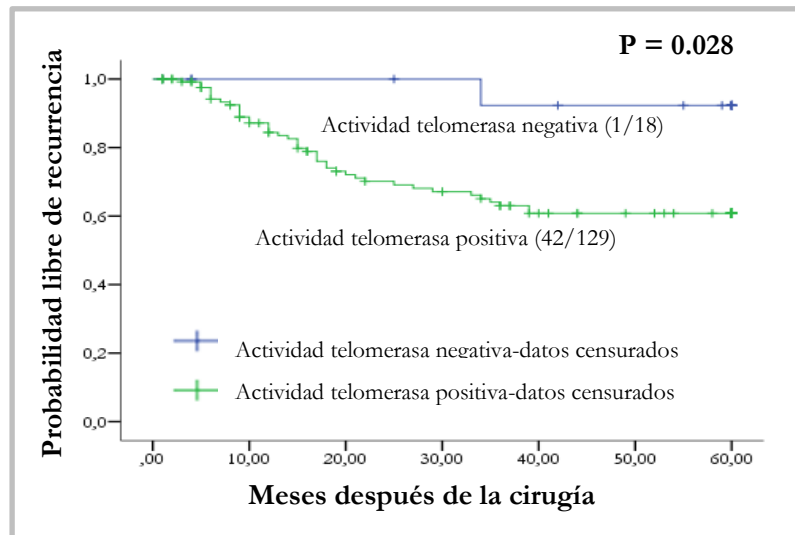


Figura 3.7. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando la actividad telomerasa. Entre paréntesis se detalla el n° de pacientes que recaen en el proceso tumoral/n° total de casos.

3.1.5. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (II).

Con el fin de relacionar las posibles diferencias halladas en el pronóstico clínico de los sujetos con un perfil molecular distintivo de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, también se realizaron los estudios de pronóstico basados en la función telomérica, en el grupo de 68 pacientes afectados de CNMP, objeto de estudio de esta Tesis, asumiendo que el número de casos para este tipo de análisis es reducido.

Considerando la **longitud telomérica media en las muestras tumorales**, el punto de corte óptimo que discrimina entre las dos subpoblaciones con un pronóstico clínico diferente se sitúa en 3.295 Kb. Las curvas de supervivencia de ambos gru-

pos mostraron diferencias próximas a la significación estadística ($P = 0.054$; Log-Rank), (**Figura 3.8**).

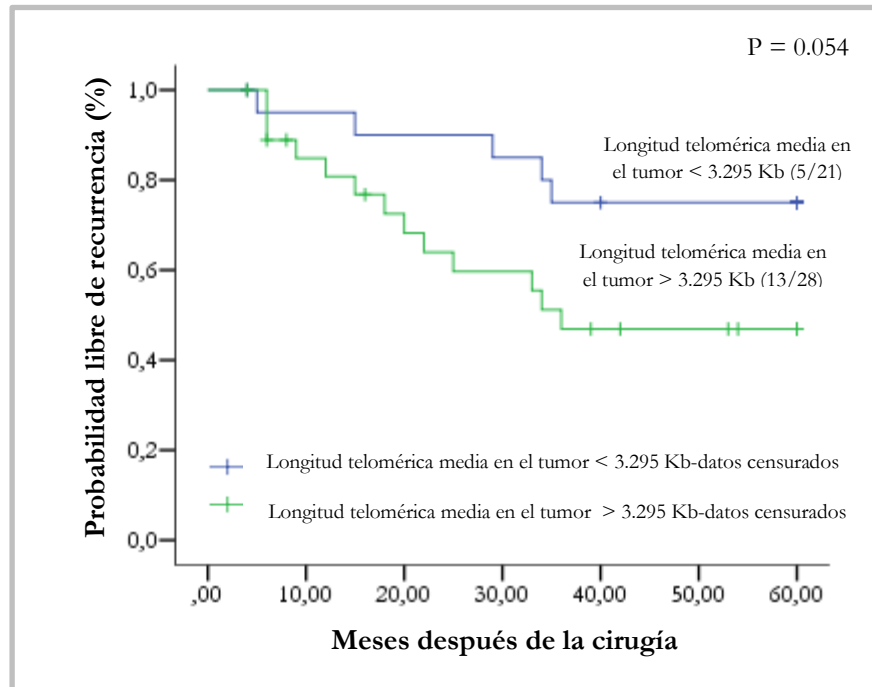


Figura 3.8. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando la longitud telomérica media en los CNMPs. Entre paréntesis se detalla el nº de pacientes que recurren en el proceso tumoral/nº total de casos.

En total formaron parte de este estudio 49 pacientes. En la siguiente tabla (**Tabla 3.10**) se detallan las características clínico-patológicas de las dos subpoblaciones:

| VARIABLE | SUBPOBLACIONES | |
|---|---------------------|---------------------|
| | LTMT < 3.295 Kb (N) | LTMT > 3.295 Kb (N) |
| SEXO | 21 | 28 |
| Femenino | 3 | 6 |
| Masculino | 18 | 22 |
| EDAD* | 64.46 ± 2.03 | 66.59 ± 1.71 |
| ESTADIO | 21 | 28 |
| I | 17 | 22 |
| II | 0 | 1 |
| IIIA | 4 | 5 |
| TIPO HISTOLÓGICO | 21 | 27# |
| Carcinoma epidermoide o de células escamosas | 11 | 15 |
| Adenocarcinoma | 7 | 12 |
| Carcinoma indiferenciado de célula grande | 3 | 0 |
| T, tumor primario | 21 | 28 |
| T1 | 5 | 10 |
| T2 | 15 | 15 |
| T3 | 1 | 3 |
| N, diseminación a los ganglios linfáticos | 21 | 28 |
| N0 | 18 | 23 |
| N1 | 0 | 1 |
| N2 | 3 | 4 |
| M, metástasis (M0) | 21 | 28 |
| RECURRENCIA | 21 | 28 |
| NO | 16 | 15 |
| SÍ | 5 | 13 |
| Longitud telomérica media en el tumor* | 2.65 ± 0.13 | 5.65 ± 0.31 |
| Longitud telomérica media en el tejido normal* | 4.05 ± 0.28 | 6.10 ± 0.36 |
| Ratio medio TRF T/ TRF N* | 0.69 ± 0.04 | 0.95 ± 0.04 |

Tabla 3.10. Resumen de las características clínico-patológicas de las dos subpoblaciones de CNMPs analizadas.

*Media ± error estándar; N: número de casos; #: información no disponible para un caso; LTMT: longitud telomérica media en el tumor.

En la siguiente tabla (**Tabla 3.11**) se detallan las características de los dos grupos, en relación a este estudio de pronóstico:

| Longitud telomérica media (tumor) | Casos | Recidivas | Datos censurados | Estimación de meses libres de enfermedad (media \pm EE) |
|-----------------------------------|-------|-----------|------------------|---|
| Inferior a 3.295 Kb | 21 | 5 | 16 | 50.90 \pm 3.76 |
| Superior a 3.295 Kb | 28 | 13 | 15 | 38.29 \pm 4.38 |

Tabla 3.11. Resumen de los subgrupos que forman parte del estudio pronóstico, en los CNMPs, en base a la longitud telomérica media de los tumores. Número de sujetos evaluados, censurados, recidivas y tiempo medio libre de enfermedad. EE: error estándar.

Puesto que se alcanzaron diferencias próximas a la significación estadística entre las curvas de supervivencia de ambas subpoblaciones, realizamos un análisis multivariante para explorar si una LTMT < 3.295 Kb constituía un factor protector ante la recurrencia en el proceso tumoral. Para el análisis multivariable de Cox sólo se consideraron el estadio tumoral y el grado de invasión ganglionar, ambas variables con un nivel de significación inferior a 0.05 en el análisis univariable.

De nuevo, el estadio y la diseminación del tumor a los ganglios linfáticos resultaron ser variables linealmente dependientes, y del mismo modo que en el caso anterior, se particularizó el análisis multivariante para el estadio *vs.* la longitud telomérica media tumoral, y la diseminación del tumor a los ganglios *vs.* la longitud telomérica media tumoral (**Tabla 3.12** y **Tabla 3.13**).

| VARIABLE | RIESGO RELATIVO | P |
|---------------------------------|-----------------|--------------|
| LTMT < 3.295 Kb | 0.32 | 0.041 |
| ESTADIO, I <i>vs.</i> II o IIIa | 0.18 | 0.003 |

Tabla 3.12. Análisis multivariante de Cox considerando la longitud telomérica y el estadio, en los cánceres no microcíticos de pulmón.

| VARIABLE | RIESGO RELATIVO | P |
|---|-----------------|--------------|
| LTMT < 3.295 Kb | 0.33 | 0.045 |
| N, diseminación a los ganglios linfáticos (N0 <i>vs.</i> N1 o N2) | 0.22 | 0.015 |

Tabla 3.13. Análisis multivariante de Cox considerando la longitud telomérica y la diseminación del tumor a los ganglios, en los cánceres no microcíticos de pulmón.

Estos análisis constataron que una LTMT < 3.295 Kb constituía un factor protector ante la recurrencia en el proceso tumoral. Así pues, el estudio pronóstico en base a la longitud media tumoral nos permitió advertir la existencia de un subgrupo de pacientes con una longitud telomérica media crítica y un manifiesto mejor pronóstico.

Si excluimos estos casos particulares (con una longitud telomérica media inferior a 3.295 Kb y un pronóstico clínico favorable), la aplicación electrónica *Cutoff Finder* nos permite identificar un nuevo punto de corte en la longitud telomérica media tumoral, situado en 5.205 Kb, que discrimina entre dos poblaciones con un pronóstico clínico significativamente diferente ($P = 0.002$; Log-Rank), (**Figura 3.9**).

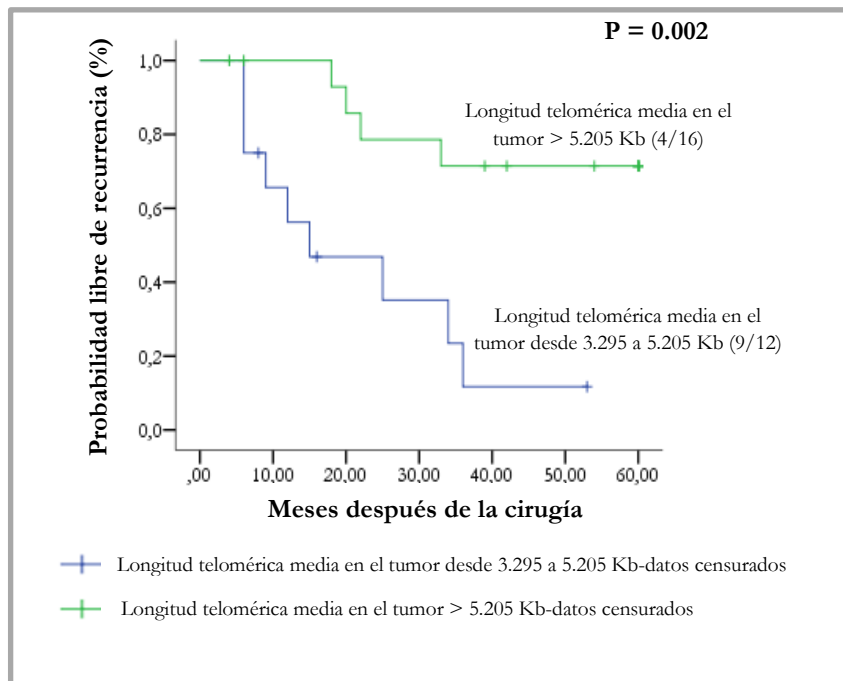


Figura 3.9. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando la longitud telomérica media en los CNMPs (excluye los casos con una longitud telomérica media en el tumor inferior a 3.295 Kb). Entre paréntesis se detalla el nº de pacientes que recurren en el proceso tumoral/nº total de casos.

Un total de 28 pacientes formaron parte de este estudio pronóstico. Doce de ellos se incluyen en el subgrupo con una longitud telomérica media en el tumor comprendida entre 3.295 y 5.205 Kb; de estadios I (8 casos), II (1 caso) y IIIa (3 casos). Nueve de estos casos considerados recidivaron en el proceso tumoral, y 3 fueron catalo-

gados como datos censurados. Dieciséis pacientes presentaron una longitud telomérica tumoral media superior a 5.205 Kb, de estadios I (14 casos) y IIIa (2 casos). Tan sólo cuatro de ellos recidivaron, los doce restantes se clasificaron como censurados.

Los sujetos de ambos grupos difieren notablemente en los meses libres de enfermedad: los individuos con telómeros más cortos (desde 3.295 a 5.205 Kb) en la muestra tumoral, presentaron un intervalo medio libre de enfermedad de 22.22 ± 4.84 meses (media \pm error estándar). Sin embargo, los pacientes con una longitud telomérica media superior a 5.205 Kb en el tumor, mostraron un intervalo medio libre de enfermedad de 49.50 ± 4.51 meses (media \pm error estándar). El análisis multivariante de Cox²³ constata que, para este subgrupo de individuos, una longitud telomérica media en el tumor comprendida entre 3.295 y 5.205 Kb constituye un factor de pronóstico adverso independiente del estadio tumoral ($P = 0.017$). Para los pacientes con esta longitud telomérica media tumoral, el riesgo relativo medio de recidivar en el proceso tumoral fue 4.65 veces superior al de los pacientes incluidos en el otro grupo (**Tabla 3.14**).

| VARIABLE | RIESGO RELATIVO | P |
|--|-----------------|-------|
| LONGITUD TELOMÉRICA MEDIA EN EL TUMOR 3.295-5.205 Kb | 4.65 | 0.017 |
| ESTADIO, I vs. II o IIIa | 0.22 | 0.086 |

Tabla 3.14. Análisis multivariante de Cox considerando la longitud telomérica y el estadio, en los cánceres no microcíticos de pulmón.

El **ratio medio de acortamiento telomérico (TRF T/TRF N)** también fue considerado para la realización de un estudio pronóstico en esta población. El punto de corte óptimo para este ratio, de acuerdo a la aplicación electrónica *Cutoff Finder*, que discrimina entre dos subpoblaciones con diferente pronóstico clínico se sitúa en 0.685 ($P = 0.043$; Log-Rank), (**Figura 3.10**). El intervalo libre de enfermedad medio para los pacientes con un ratio medio TRF T/TRF N inferior a 0.685²⁴ fue de 55.50 ± 4.27 meses (media \pm error estándar); y para los pacientes con un ratio superior a 0.685²⁵ fue de 40.62 ± 3.59 meses (media \pm error estándar).

²³ En esta subpoblación de 28 pacientes, el grado de diseminación del tumor a los ganglios linfáticos no resultó ser una variable con significación estadística en el análisis univariante.

²⁴ Longitud telomérica media tumoral: 2.65 ± 0.18 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 4.83 ± 0.33 Kb.

²⁵ Longitud telomérica media tumoral: 4.86 ± 0.32 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 5.34 ± 0.34 Kb.

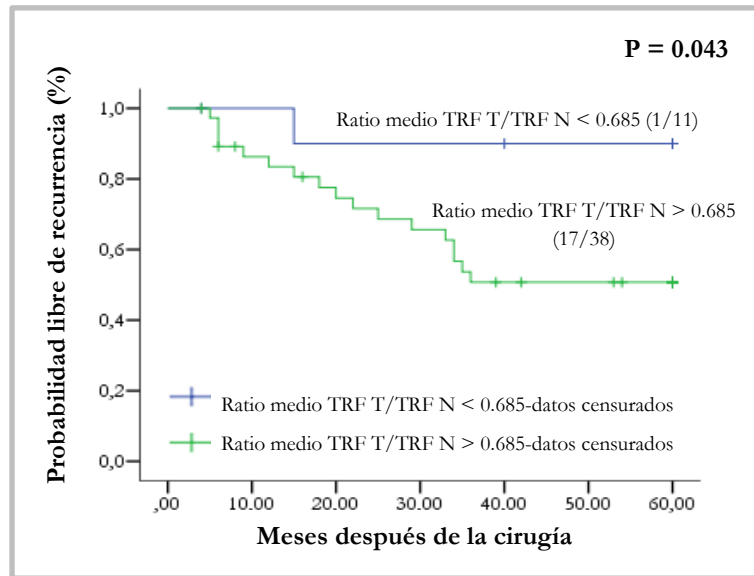


Figura 3.10. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando el ratio medio TRF T/TRF N. Entre paréntesis se detalla el n° de pacientes que recurren en el proceso tumoral/n° total de casos.

Las características de ambos subgrupos en relación a este estudio de pronóstico se detallan a continuación (**Tabla 3.15**).

| Ratio medio TRF T/TRF N | Casos | Recidivas | Datos censurados | Estimación de meses libres de enfermedad (media \pm EE) |
|-------------------------|-------|-----------|------------------|---|
| Inferior a 0.685 | 11 | 1 | 10 | 55.50 \pm 4.27 |
| Superior a 0.685 | 38 | 17 | 21 | 40.62 \pm 3.59 |

Tabla 3.15. Resumen de los subgrupos que forman parte del estudio pronóstico, en CNMP, en base al ratio medio TRF T/TRF N. Número de sujetos evaluados, censurados, recidivas y tiempo medio libre de enfermedad. EE: error estándar.

De acuerdo a estos resultados, un acortamiento telomérico acusado en los tumores, respecto al tejido normal, parece otorgar un pronóstico clínico mejor. No obstante, no constituye un factor de pronóstico independiente, ni del estadio tumoral ($P = 0.069$; análisis multivariante de Cox), ni del grado de diseminación del tumor a los ganglios ($P = 0.072$; análisis multivariante de Cox). Además, el subgrupo de sujetos con un ratio medio TRF T/TRF N inferior a 0.685 incluye a los pacientes con una

longitud telomérica media de 2.65 ± 0.18 Kb (media \pm error estándar). Si excluimos de nuevo a los sujetos con una longitud telomérica media inferior a 3.295 Kb, el nuevo punto de corte para el ratio TRF T/TRF N, que determina la aplicación electrónica, se halla en 0.98; y discrimina entre dos subpoblaciones con un pronóstico clínico significativamente diferente ($P = 0.045$; Log-Rank), (**Figura 3.11**).

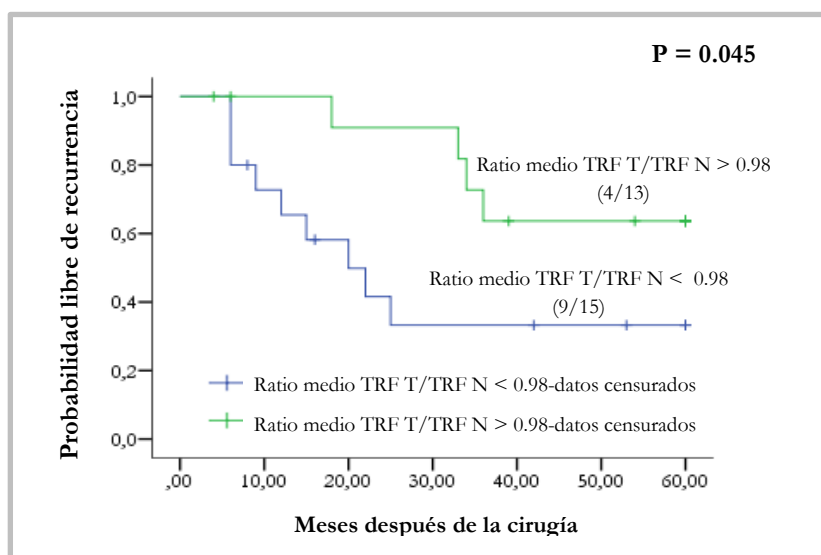


Figura 3.11. Curvas de supervivencia, en CNMP, mediante el método de Kaplan-Meier considerando el ratio medio TRF T/TRF N (excluye los casos con una longitud telomérica media en el tumor inferior a 3.295 Kb). Entre paréntesis se detalla el n° de pacientes que recurren en el proceso tumoral/n° total de casos.

En la siguiente tabla (**Tabla 3.16**) se detallan las características de ambos grupos en relación a este estudio pronóstico.

| Ratio medio TRF T/ TRF N | Casos | Recidivas | Datos censurados | Estimación de meses libres de enfermedad (media \pm EE) |
|-------------------------------|-------|-----------|------------------|---|
| Inferior a 0.98 ²⁶ | 15 | 9 | 6 | 29.33 \pm 6.15 |
| Superior a 0.98 ²⁷ | 13 | 4 | 9 | 49.18 \pm 4.51 |

Tabla 3.16. Resumen de los subgrupos que forman parte del estudio pronóstico en base al ratio medio TRF T/TRF N. Número de sujetos evaluados, censurados, recidivas y tiempo medio libre de enfermedad. EE: error estándar.

²⁶ Longitud telomérica media tumoral: 5.05 ± 0.38 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 6.40 ± 0.53 Kb.

²⁷ Longitud telomérica media tumoral: 6.33 ± 0.45 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 5.76 ± 0.48 Kb.

Excluyendo a los casos con una longitud telomérica crítica, el acortamiento de las secuencias teloméricas en el tumor, respecto al tejido normal, otorga un pronóstico clínico desfavorable. Sin embargo, no constituye un factor pronóstico independiente al estadio tumoral ($P = 0.111$; análisis multivariante de Cox²⁸).

En relación a la **actividad telomerasa**, en este grupo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el pronóstico de los pacientes con actividad telomerasa positiva *vs.* actividad telomerasa negativa, en la muestra tumoral ($P = 0.45$; Log-Rank). Formaron parte de este estudio sesenta y un pacientes. No obstante, tan solo uno de los cinco individuos carentes de actividad telomerasa en la muestra tumoral, recidivó en el proceso tumoral. En las muestras tumorales de cincuenta y seis pacientes sí se detectó actividad telomerasa, y dieciocho de ellos mostraron recurrencia.

²⁸ En esta subpoblación de 28 pacientes, el grado de diseminación del tumor a los ganglios linfáticos no resultó ser una variable con significación estadística en el análisis univariante.

3.2. Estudio de la función telomérica en los tumores colorrectales y su relación con las variables clínico-patológicas. Estudios de pronóstico.

3.2.1. La longitud telomérica y la actividad telomerasa.

La longitud telomérica media se obtuvo para un total de cincuenta y seis tumores colorrectales. En las muestras no tumorales, la longitud telomérica media fue de 5.41 ± 0.28 Kb y para los tumores, 3.80 ± 0.18 Kb. Podemos afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas ($P < 0.001$; prueba t de Student), (**Figura 3.12**) y que están correlacionadas linealmente (correlación de Pearson = 0.445; P valor asociado = 0.001), (**Figura 3.13**).

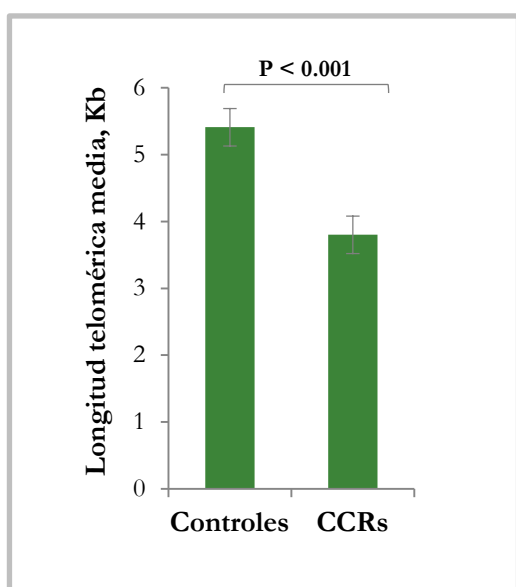


Figura 3.12. La longitud telomérica en las muestras de CCR y en los controles.

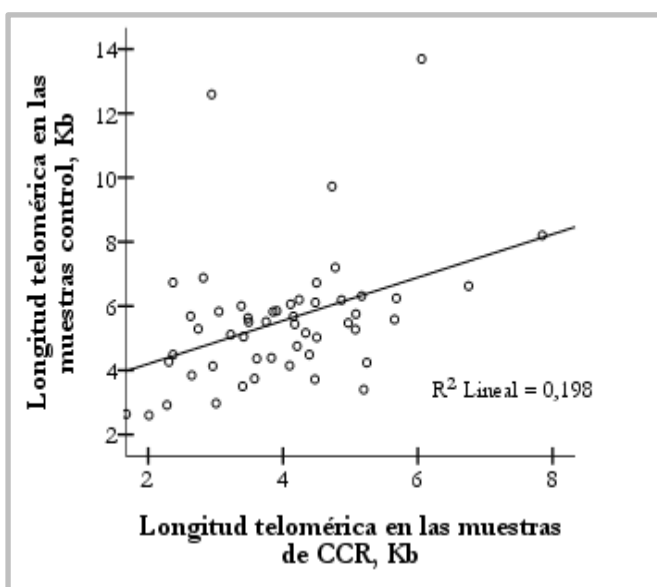


Figura 3.13. Diagrama de dispersión para las longitudes teloméricas (Kb) en las muestras de CCR y controles.

El valor medio del ratio TRF T/TRF N fue 0.74 ± 0.03 . La siguiente figura (**Figura 3.14**) ejemplifica la técnica de *Southern-blot* empleada para la medida de la longitud de los fragmentos teloméricos en cinco parejas de muestras (tumores colorrectales y sus correspondientes muestras control).

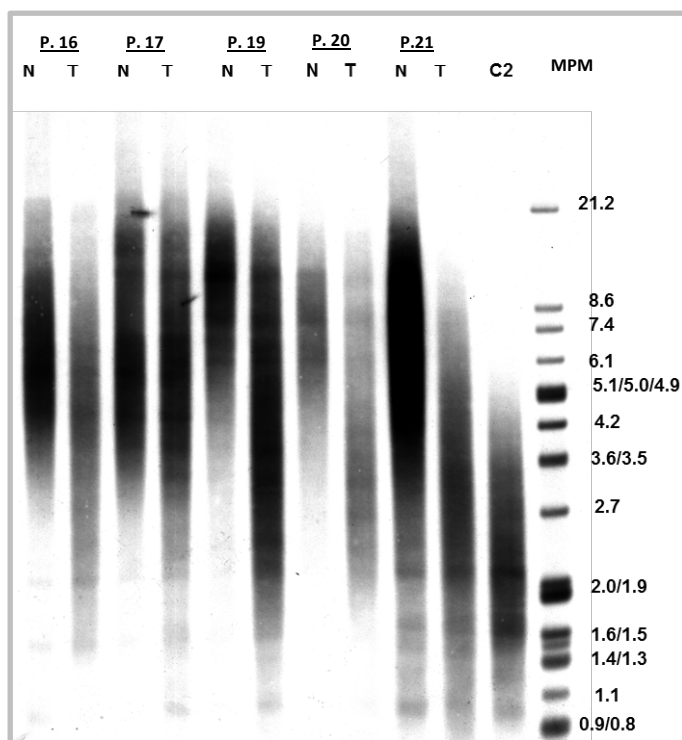


Figura 3.14. Resultado de la hibridación con la sonda complementaria a las repeticiones teloméricas por *Southern-blot*. Se muestra: en el extremo derecho, el marcador de peso molecular (MPM), empleado para determinar la longitud de los telómeros de las distintas muestras, con sus correspondientes valores de peso molecular, expresados en Kb. P: paciente; N: muestra control; T: muestra tumoral; C2: control de bajo peso molecular.

En cincuenta y una de las 60 muestras tumorales se detectó actividad telomerasa; no así en las nueve restantes. La longitud telomérica media entre ambos grupos es similar ($P = 0.493$; prueba t de Student), (Tabla 3.17).

| ACTIVIDAD TELOMERASA | Nº DE CASOS | LONGITUD TELOMÉRICA (Kb), EN CCRs (media \pm EE) | P |
|----------------------|-------------|--|-------|
| POSITIVA | 48 | 3.75 ± 0.19 | 0.493 |
| NEGATIVA | 8 | 4.11 ± 0.55 | |

Tabla 3.17. La actividad telomerasa y la longitud telomérica en los CCRs (para los 56 tumores de los que se dispuso de la información de longitud telomérica media). EE: error estándar.

El ratio TRF T/TRF N, para el grupo de tumores con actividad telomerasa positiva fue 0.72 ± 0.04 (media \pm error estándar), y para el grupo de tumores sin actividad telomerasa, 0.83 ± 0.06 (media \pm error estándar).

3.2.2. La longitud telomérica y su relación con las variables clínico-patológicas.

La asociación entre la longitud telomérica media en las muestras de CCR y las variables clínico-patológicas se detalla en la siguiente tabla (**Tabla 3.18**).

| VARIABLE | Nº DE CASOS | LONGITUD TELOMÉRICA (Kb), EN CCRs (media \pm EE) | P Y PRUEBA ESTADÍSTICA |
|--|-------------|--|----------------------------------|
| ESTADIO | 52 | | |
| A | 10 | 3.44 \pm 0.27 | P = 0.415; ANOVA de un factor |
| B | 28 | 4.11 \pm 0.29 | |
| C | 10 | 3.47 \pm 0.47 | |
| D | 4 | 3.48 \pm 0.53 | |
| T, tumor primario | 53 | | |
| T1 | 2 | 3.30 \pm 0.08 | P = 0.600; ANOVA de un factor |
| T2 | 10 | 3.65 \pm 0.30 | |
| T3 | 35 | 4.03 \pm 0.25 | |
| T4 | 6 | 3.37 \pm 0.54 | |
| N, invasión a los ganglios linfáticos | 52 | | |
| N0 | 39 | 3.96 \pm 0.22 | P = 0.537; ANOVA de un factor |
| N1 | 7 | 3.73 \pm 0.45 | |
| N2 | 6 | 3.30 \pm 0.65 | |
| LOCALIZACIÓN | 52 | | |
| DERECHO | 13 | 4.18 \pm 0.36 | P = 0.453; ANOVA de un factor |
| IZQUIERDO | 19 | 3.55 \pm 0.30 | |
| RECTO | 20 | 3.88 \pm 0.33 | |

Tabla 3.18. La longitud telomérica en los CCRs y su relación con las variables clínico-patológicas. EE: error estándar.

Los resultados expuestos evidencian que la longitud telomérica media en las muestras de CCR no presenta diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes categorías de las variables clínico-patológicas, objeto de estudio.

También exploramos la asociación entre las variables clínico-patológicas y el cociente TRF T/TRF N (**Tabla 3.19**).

| VARIABLE | Nº DE CASOS | TRF T/TRF N (media \pm EE) | P Y PRUEBA ESTADÍSTICA |
|--|-------------|------------------------------|----------------------------------|
| ESTADIO | 52 | | |
| A | 10 | 0.71 \pm 0.04 | P = 0.798; ANOVA de un factor |
| B | 28 | 0.76 \pm 0.06 | |
| C | 10 | 0.67 \pm 0.06 | |
| D | 4 | 0.74 \pm 0.11 | |
| T, tumor primario | 53 | | |
| T1 | 2 | 0.60 \pm 0.03 | P = 0.751; ANOVA de un factor |
| T2 | 10 | 0.70 \pm 0.05 | |
| T3 | 35 | 0.77 \pm 0.05 | |
| T4 | 6 | 0.73 \pm 0.04 | |
| N, invasión a los ganglios linfáticos | 52 | | |
| N0 | 39 | 0.75 \pm 0.04 | P = 0.810; ANOVA de un factor |
| N1 | 7 | 0.71 \pm 0.05 | |
| N2 | 6 | 0.69 \pm 0.11 | |
| LOCALIZACIÓN | 52 | | |
| DERECHO | 13 | 0.75 \pm 0.04 | P = 0.017; ANOVA de un factor |
| IZQUIERDO | 19 | 0.61 \pm 0.06 | |
| RECTO | 20 | 0.84 \pm 0.06 | |

Tabla 3.19. Ratio de acortamiento telomérico y su relación con las variables clínico-patológicas. EE: error estándar.

De acuerdo con los resultados expuestos en la tabla anterior, podemos afirmar que existen diferencias estadísticamente significativas para el valor del ratio medio TRF T/TRF N entre los distintos grupos establecidos, según la localización del carcinoma colorrectal. Para los tumores localizados en el colon izquierdo, el acortamiento telomérico se sitúa en valores próximos al 40%, mientras que para los tumores localizados en el recto, apenas supera el 15%.

3.2.3. La actividad telomerasa y su relación con las variables clínico-patológicas.

Para los carcinomas colorrectales, podemos concluir que no existe ninguna asociación entre la actividad telomerasa y las variables clínico-patológicas consideradas en esta Tesis (**Tabla 3.20**).

| VARIABLE | Nº DE CASOS | ACTIVIDAD TELOMERASA | | P; χ^2 |
|--|-------------|----------------------|----------|-------------|
| | | NEGATIVA | POSITIVA | |
| ESTADIO | 56 | | | |
| A | 11 | 0 | 11 | 0.377 |
| B | 28 | 5 | 23 | |
| C | 10 | 2 | 8 | |
| D | 7 | 2 | 5 | |
| T, tumor primario | 57 | | | |
| T1 | 2 | 0 | 2 | 0.335 |
| T2 | 11 | 0 | 11 | |
| T3 | 37 | 8 | 29 | |
| T4 | 7 | 1 | 6 | |
| N, invasión a los ganglios linfáticos | 56 | | | |
| N0 | 41 | 6 | 35 | 0.622 |
| N1 | 8 | 1 | 7 | |
| N2 | 7 | 2 | 5 | |
| LOCALIZACIÓN | 56 | | | |
| DERECHO | 14 | 4 | 10 | 0.132 |
| IZQUIERDO | 20 | 3 | 17 | |
| RECTO | 22 | 1 | 21 | |

Tabla 3.20. La actividad telomerasa en los CCRs y su relación con las variables clínico-patológicas.

3.2.4. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (I).

Con el fin de aumentar el tamaño muestral para la realización de los estudios de pronóstico, y de igual modo que en el CNMP, la información clínico-patológica y de función telomérica de los 60 pacientes afectados de cáncer colorrectal, considerados en esta Tesis, se incorporó a la base de datos de 100 pacientes con CCR, considerados en estudios previos de nuestro grupo de investigación. De esta forma, se dispuso de una población de 160 pacientes. De igual modo, las muestras tisulares se obtuvieron a partir de pacientes afectados de cáncer colorrectal, e intervenidos quirúrgicamente en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo y Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. En todos los casos se dispuso de una muestra de tejido tumoral y no tumoral del mismo paciente.

Las características clínico-patológicas de la población considerada en los estudios de pronóstico (I) se resumen en la siguiente tabla (**Tabla 3.21**).

| VARIABLE | | NÚMERO DE CASOS |
|---------------------------------|-----------|-----------------|
| SEXO | | 160 |
| | Femenino | 82 |
| | Masculino | 78 |
| EDAD | | 160 |
| | ≤ 71 años | 67 |
| | > 71 años | 63 |
| ESTADIO¹ | | 149 |
| | A | 22 |
| | B | 63 |
| | C | 38 |
| | D | 26 |
| LOCALIZACIÓN¹ | | 152 |
| | Derecho | 40 |
| | Izquierdo | 33 |
| | Recto | 79 |
| RECURRENCIA¹ | | 137 |
| | NO | 119 |
| | SÍ | 18 |

Tabla 3.21. Características clínico-patológicas de los carcinomas colorrectales, de la población incluida en los estudios de pronóstico. ¹Para el estadio, la localización y la recurrencia en el proceso tumoral, no se dispuso de la información para 11, 8 y 23 casos, respectivamente.

La longitud telomérica media (media \pm error estándar) para las muestras de tumores colorrectales fue 5.49 ± 0.23 Kb y 7.32 ± 0.33 Kb para las muestras no tumorales. La longitud telomérica media entre ambos grupos es significativamente diferente ($P < 0.001$; prueba de Wilcoxon) y podemos afirmar que existe una relación lineal positiva entre las dos variables (correlación de Spearman = 0.685; P valor asociado < 0.001), (**Figura 3.15**). El valor medio del cociente TRF T/TRF N fue 0.79 ± 0.02 .

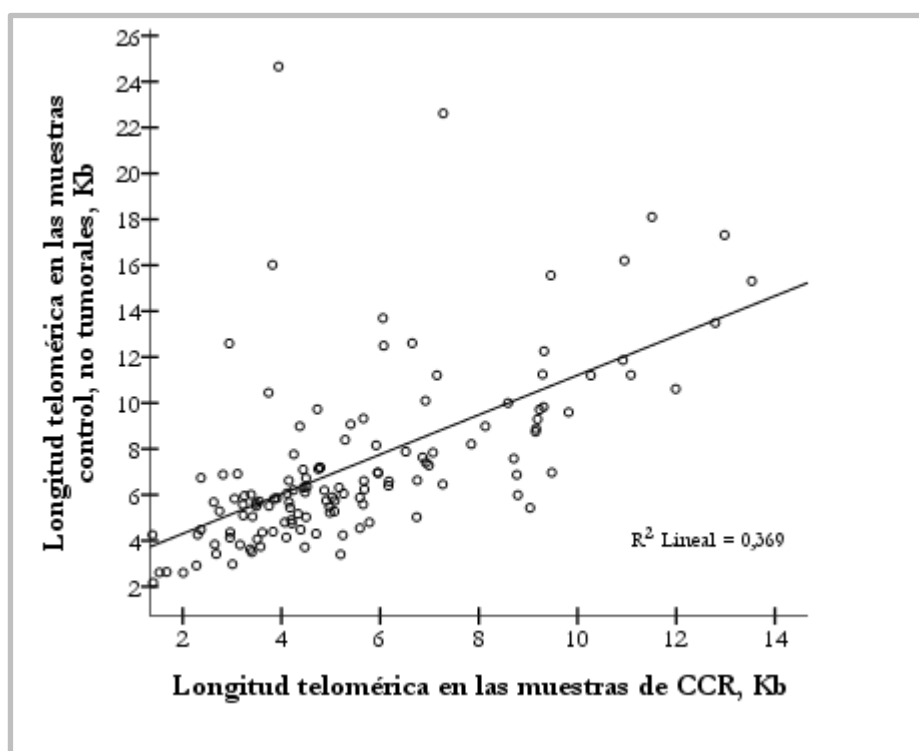


Figura 3.15. Diagrama de dispersión para las longitudes teloméricas (Kb) en las muestras de CCR y controles.

En un total de 126 (82.4%) tumores se detectó actividad telomerasa y veintisiete (17.6%) carecían de ella²⁹. No existen diferencias estadísticamente significativas entre la longitud telomérica media para las muestras de CCR con actividad telomerasa positiva (5.53 ± 0.27 Kb) vs. el grupo con actividad telomerasa negativa (5.46 ± 0.51 Kb), ($P = 0.763$; U de Mann-Whitney). El cociente TRF T/TRF N para el grupo de tumores con actividad telomerasa positiva fue 0.77 ± 0.03 y para el grupo sin actividad telomerasa, 0.83 ± 0.04 .

²⁹ Información no disponible para 7 casos.

El estudio de pronóstico basado en la longitud telomérica media de las muestras de cáncer colorrectal nos permitió discriminar entre dos poblaciones con diferente evolución clínica. Mediante la aplicación electrónica *Cutoff Finder* (Budczies *et al.*, 2012) identificamos el punto de corte óptimo para la longitud telomérica que establece dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico. El método de Kaplan-Meier fue el procedimiento elegido para estimar las curvas de supervivencia, y el test Log-Rank para compararlas entre sí.

En total formaron parte de este estudio 101 pacientes. El punto de corte óptimo que discrimina entre las dos subpoblaciones con un pronóstico clínico significativamente diferente se sitúa en 6.35 Kb ($P < 0.001$; Log-Rank), (Figura 3.16). Así pues, el pronóstico de los pacientes afectados de CCR parece verse afectado por la longitud telomérica media tumoral.

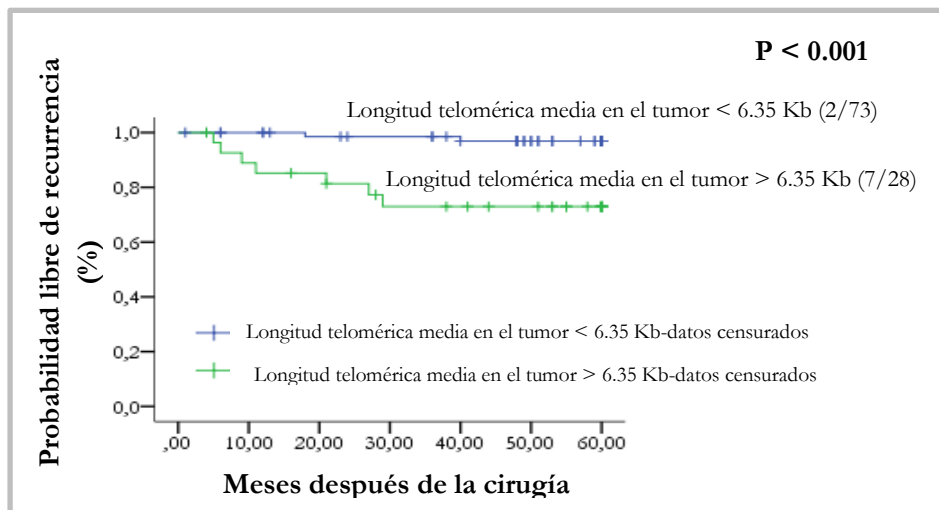


Figura 3.16. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando la longitud telomérica media en los CCRs. Entre paréntesis se detalla el nº de pacientes que recurren en el proceso tumoral/nº total de casos.

En la siguiente tabla (**Tabla 3.22**) se detallan las características en relación a este estudio de pronóstico, para los dos grupos:

| Longitud telomérica media (tumor) | Casos | Recidivas | Casos censurados | Estimación de meses libres de enfermedad (media \pm EE) |
|-----------------------------------|-------|-----------|------------------|---|
| Inferior a 6.35 Kb | 73 | 2 | 71 | 59.05 \pm 0.69 |
| Superior a 6.35 Kb | 28 | 7 | 21 | 48.08 \pm 3.94 |

Tabla 3.22. Resumen de los subgrupos que forman parte del estudio pronóstico en base a la longitud telomérica media de los tumores. Número de casos evaluados, censurados, recidivas y tiempo medio libre de enfermedad. EE: error estándar.

El análisis multivariante de Cox (**Tabla 3.23**) constata que una longitud telomérica media tumoral inferior a 6.35 Kb constituye un factor de pronóstico favorable, independiente del estadio tumoral ($P = 0.017$).

| VARIABLE | RIESGO RELATIVO | P |
|---|-----------------|--------------|
| LONGITUD TELOMÉRICA MEDIA EN EL TUMOR < 6.35 Kb | 0.145 | 0.017 |
| ESTADIO, A o B vs. C | 0.059 | 0.008 |

Tabla 3.23. Análisis multivariante de Cox considerando la longitud telomérica y el estadio tumoral, en los cánceres colorrectales.

El impacto del **ratio TRF T/TRF N sobre el pronóstico de los pacientes afectados de CCR** también fue objeto de estudio. En este caso, el punto de corte óptimo se sitúa en 0.665, y marca la diferencia entre dos subpoblaciones con un pronóstico clínico significativamente diferente ($P = 0.043$; Log-Rank), (**Figura 3.17**).

En total formaron parte de este estudio 101 casos. Treinta y tres³⁰ de ellos con un ratio medio TRF T/ TRF N inferior a 0.665, ninguno de los cuales recidivó en el proceso tumoral, y sesenta y ocho³¹ con un ratio medio TRF T/TRF N superior a 0.665, nueve de ellos mostraron recurrencia de la enfermedad. El análisis multivariante de Cox no se realizó en este caso porque ningún individuo con un ratio medio

³⁰ Longitud telomérica media tumoral: 4.17 ± 0.4 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 8.98 ± 0.95 Kb.

³¹ Longitud telomérica media tumoral: 6.08 ± 0.32 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 6.66 ± 0.33 Kb.

TRF T/TRF N recurrió en el proceso tumoral (se hubiera obtenido un valor indefinido para el riesgo relativo).

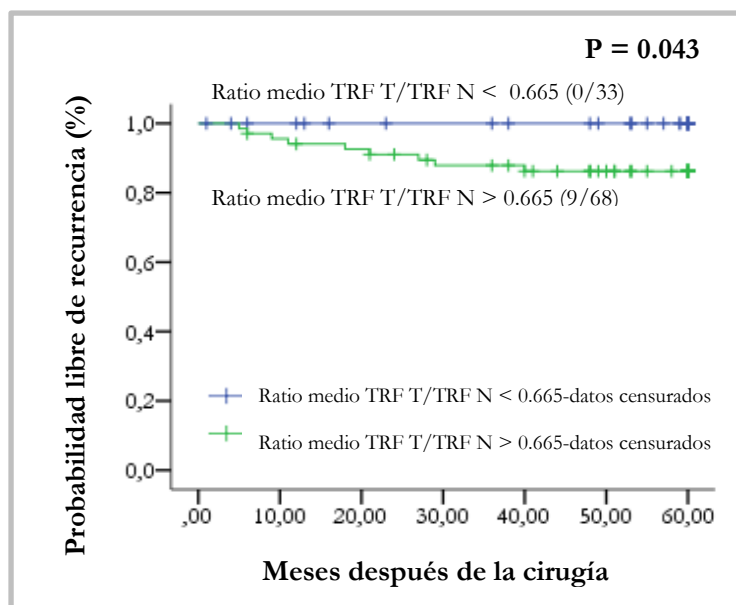
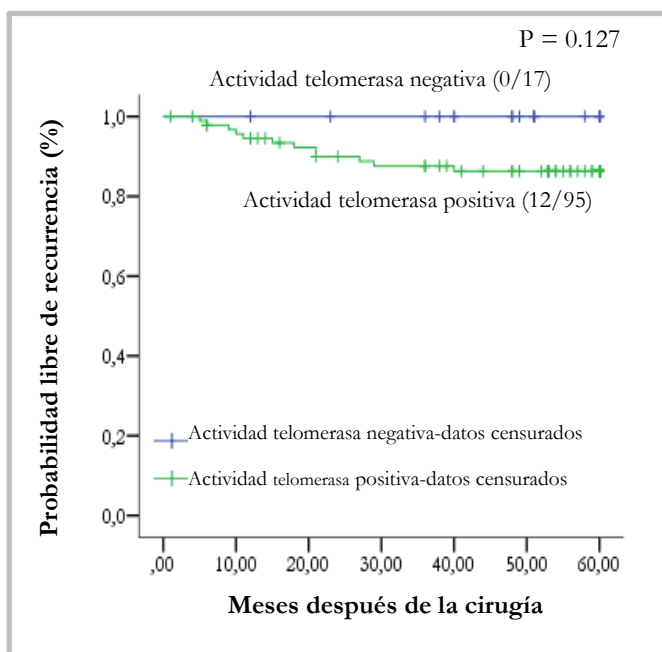


Figura 3.17. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando el ratio medio TRF T/TRF N. Entre paréntesis se detalla el n° de pacientes que recurren en el proceso tumoral/n° total de casos.

Por último, **en relación a la actividad telomerasa**, no podemos afirmar que existan diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia de ambos grupos (actividad telomerasa positiva *vs.* actividad telomerasa negativa), para la población objeto de estudio ($P = 0.127$; Log-Rank), (**Figura 3.18**).

Ciento doce pacientes se incluyeron en este estudio: diecisiete de ellos carecían de actividad telomerasa en la muestra tumoral, y ninguno de ellos recidivó en el proceso tumoral; en los noventa y cinco restantes sí se detectó actividad telomerasa en el tumor, y doce de ellos recurrieron en la enfermedad.

Figura 3.18. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando la actividad telomerasa. Entre paréntesis se detalla el n° de pacientes que recurren en el proceso tumoral/n° total de casos.



3.2.5. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (II).

Los estudios de pronóstico también se realizaron en la población de sesenta pacientes afectados de CCR, objeto de estudio de esta Tesis, aceptando que el tamaño muestral para este tipo de análisis puede ser comprometido. De nuevo, nuestro objetivo se basaba en relacionar las posibles diferencias halladas en el pronóstico clínico de los sujetos con un perfil molecular distintivo de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular.

Los **estudios de pronóstico basados en la longitud telomérica media tumoral** para esta población, no permiten discriminar entre dos subgrupos con distinta evolución. En total formaron parte de estudio 45 pacientes, y tan sólo uno de ellos recurrió durante el periodo de seguimiento de la serie. De acuerdo a la aplicación electrónica *Cutoff Finder*, el punto de corte que maximiza las diferencias se sitúa en 4.29 Kb, para la longitud telomérica media tumoral, y en 0.835 para el ratio TRF T/TRF N.

Veintiocho pacientes presentaron una longitud telomérica media tumoral inferior a 4.29 Kb, y ninguno de ellos recidivó en el proceso tumoral. En diecisiete casos, la longitud telomérica media en el tumor excedía de 4.29 Kb, y uno de ellos sí recurrió en la enfermedad. Las curvas de supervivencia entre ambos grupos distaban de ser significativamente diferentes ($P = 0.216$; Log-Rank), (**Figura 3.19**).

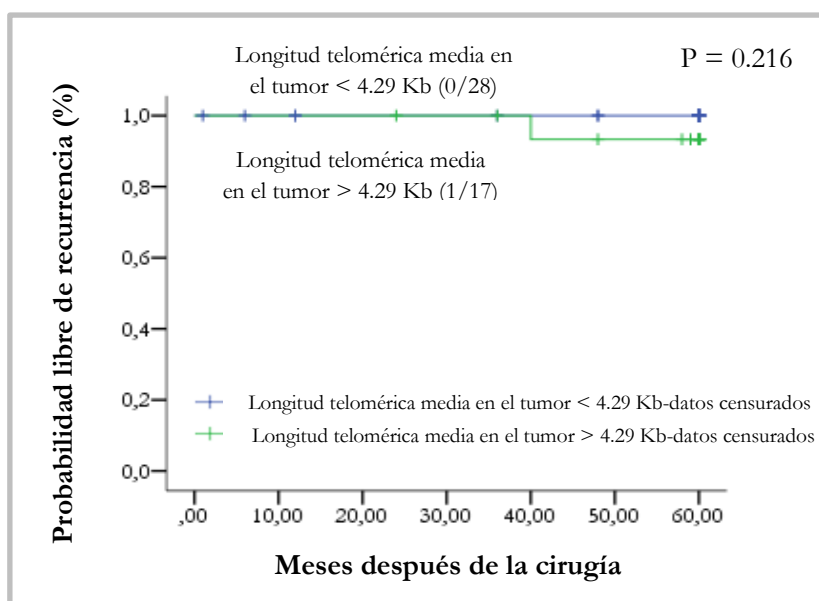


Figura 3.19. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando la longitud telomérica media en los CCRs. Entre paréntesis se detalla el nº de pacientes que recurren en el proceso tumoral/nº total de casos.

En relación al **ratio TRF T/TRF N**, treinta de los cuarenta y cinco pacientes considerados en este estudio, mostraron un cociente TRF T/TRF N inferior a 0.835³², y ninguno de ellos mostró recidiva; quince individuos presentaron un ratio TRF T/TRF N superior a 0.835³³, y uno de ellos recurrió en el proceso tumoral. Las curvas de supervivencia apenas mostraron diferencias ($P = 0.141$; Log -Rank), (**Figura 3.20**).

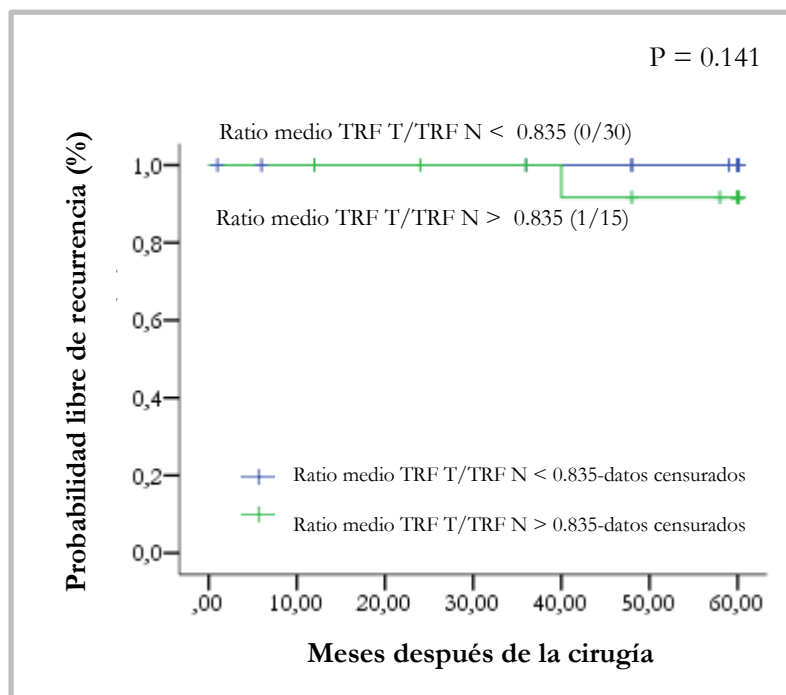


Figura 3.20. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando el ratio medio TRF T/ TRF N. Entre paréntesis se detalla el n° de pacientes que recurren en el proceso tumoral/n° total de casos.

³² Longitud telomérica media tumoral: 3.28 ± 0.22 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 5.78 ± 0.43 Kb.

³³ Longitud telomérica media tumoral: 5.04 ± 0.30 Kb. Longitud telomérica media en el tejido no tumoral: 5.14 ± 0.33 Kb.

Finalmente, el **estudio de pronóstico basado en la actividad telomerasa** incluye a un total de cuarenta y seis pacientes, siete de ellos carentes de actividad telomerasa en la muestra tumoral, ninguno de los cuales mostró recurrencia. Treinta y nueve tumores sí mostraron actividad telomerasa, y uno de ellos recidivó en el proceso tumoral. Las curvas de supervivencia de ambos grupos fueron muy similares ($P = 0.697$; Log-Rank), (**Figura 3.21**).

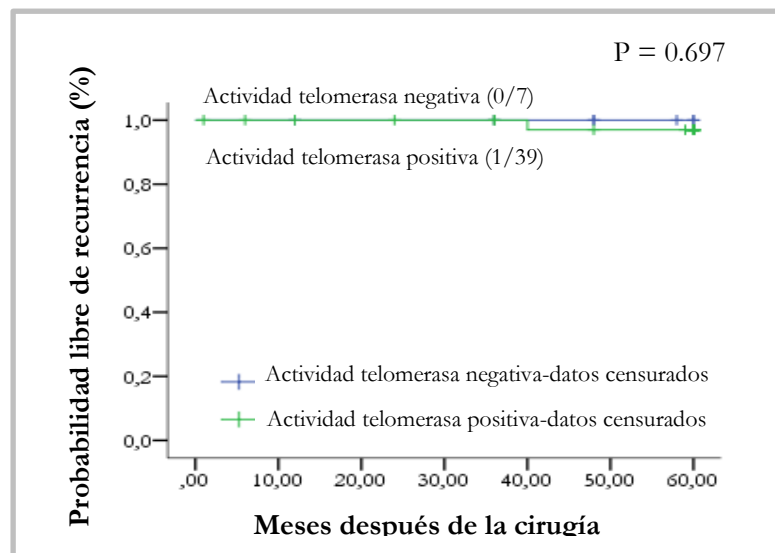


Figura 3.21. Curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier considerando la actividad telomerasa. Entre paréntesis se detalla el n° de pacientes que recurren en el proceso tumoral/n° total de casos.

3.3. Ensayo de expresión génica de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral. Relación con el estatus telomérico.

3.3.1. Ensayo de expresión con matrices de oligonucleótidos.

Mediante el empleo de matrices de oligonucleótidos, comparamos el perfil de expresión génica (en CNMPs *vs.* CCRs, con acortamiento telomérico³⁴) de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular (*Oligo GEArray*[®] *Human p53 Signaling Pathway Microarray*, SABiosciences) y transformación y génesis tumoral (*Oligo GEArray*[®] *Human Cancer PathwayFinder*, SABiosciences). El principal objetivo de este estudio consiste en explorar si el diferente pronóstico clínico que otorga el estatus telomérico en ambos tipos tumorales, se sustenta en una expresión distinta de factores relacionados con estas vías.

Los estudios de expresión con matrices de oligonucleótidos se llevaron a cabo en un número reducido de muestras de CNMP y CCR, con objeto de realizar un estudio preliminar que permitiese seleccionar los genes que mostrasen las diferencias de expresión más acusadas, entre ambos tipos tumorales. Posteriormente, en el análisis de validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real, se analizaron el total de las muestras consideradas de ambas patologías.

En el caso de la matriz de oligonucleótidos *Oligo GEArray*[®] *Human p53 Signaling Pathway Microarray* (SABiosciences) se comparó el perfil de expresión génica de seis muestras de cáncer colorrectal *vs.* ocho muestras de tumores no microcíticos de pulmón, con acortamiento telomérico. A continuación se muestra un ejemplo (**Figura 3.22**) y se detallan en la siguiente tabla (**Tabla 3.24**) las características de las muestras consideradas en relación al estatus telomérico.

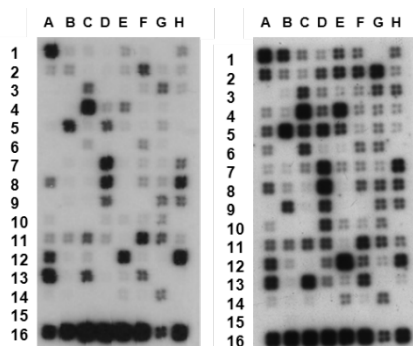


Figura 3.22. Ejemplo de dos matrices de oligonucleótidos *Oligo GEArray*[®] *Human p53 Signaling Pathway Microarray* (SABiosciences) hibridadas con ARN marcado, procedentes de una muestra de CCR con acortamiento telomérico (izquierda) y una muestra de CNMP con acortamiento telomérico (derecha).

³⁴ Se consideran, de aquí en adelante, tumores con acortamiento telomérico si el cociente TRF T/TRF N < 1.

| PATOLOGÍA | MUESTRA (ref. del laboratorio) | LTM TUMOR (Kb) | LTM CONTROL (Kb) | RATIO TRF T/TRF N |
|-----------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| CCRs | 1 | 4.11 | 6.06 | 0.68 |
| | 3 | 4.50 | 6.73 | 0.67 |
| | 11 | 3.05 | 5.83 | 0.52 |
| | 12 | 3.85 | 5.83 | 0.68 |
| | 14 | 2.63 | 5.68 | 0.46 |
| | 20 | 3.22 | 5.11 | 0.63 |
| CNMPs | 1 | 3.25 | 5.79 | 0.56 |
| | 3 | 1.62 | 2.08 | 0.78 |
| | 7 | 3.11 | 4.57 | 0.68 |
| | 9 | 3.25 | 5.79 | 0.56 |
| | 13 | 2.80 | 5.29 | 0.53 |
| | 60 | 6.88 | 10.05 | 0.78 |
| | 78 | 6.99 | 9.45 | 0.74 |
| | 146 | 4.52 | 8.01 | 0.56 |

Tabla 3.24. Características de los CCRs y de los CNMPs considerados en este análisis, en relación al estatus telomérico.

LTM: longitud telomérica media; ref.: referencia.

Para la matriz de oligonucleótidos *Oligo GEMarray® Human Cancer PathwayFinder* (SABiosciences) se comparó el perfil de expresión génica de seis muestras de CCR *vs.* siete muestras de CNMP, con acortamiento telomérico. También se muestra un ejemplo (**Figura 3.23**) y se detallan las características en relación al estatus telomérico (**Tabla 3.25**).

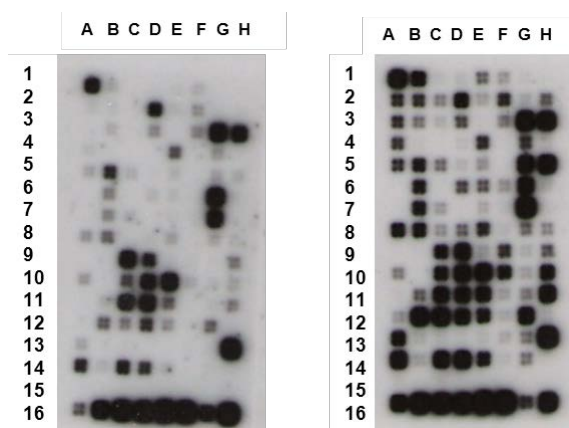


Figura 3.23. Ejemplo de dos matrices de oligonucleótidos *Oligo GEMarray® Human Cancer PathwayFinder* (SABiosciences) hibridadas con ARN marcado, procedentes de una muestra de CCR con acortamiento telomérico (izquierda) y una muestra de CNMP con acortamiento telomérico (derecha).

| PATOLOGÍA | MUESTRA (ref. del laboratorio) | LTM TUMOR (Kb) | LTM CONTROL (Kb) | RATIO TRF T/TRF N |
|-----------|-----------------------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| CCRs | 1 | 4.11 | 6.06 | 0.68 |
| | 3 | 4.50 | 6.73 | 0.67 |
| | 11 | 3.05 | 5.83 | 0.52 |
| | 12 | 3.85 | 5.83 | 0.68 |
| | 14 | 2.63 | 5.68 | 0.46 |
| | 20 | 3.22 | 5.11 | 0.63 |
| CNMPs | 1 | 3.25 | 5.79 | 0.56 |
| | 2 | 2.17 | 2.83 | 0.77 |
| | 6 | 3.98 | 4.97 | 0.80 |
| | 9 | 3.25 | 5.79 | 0.56 |
| | 13 | 2.80 | 5.29 | 0.53 |
| | 78 | 6.99 | 9.45 | 0.74 |
| | 146 | 4.52 | 8.01 | 0.56 |

Tabla 3.25. Características de los CCRs y de los CNMPs considerados en este análisis, en relación al estatus telomérico.

LTM: longitud telomérica media; ref.: referencia.

Los resultados del análisis comparativo de las matrices de oligonucleótidos, con el *software GEArray Expression Analysis Suite* (SuperArray-Bioscience Corporation® SA-Biosciences), mostraron la sobre-expresión significativa ($P \leq 0.01$) de una serie de genes, en los CNMPs, en comparación a los CCRs, ambos con acortamiento telomérico, tras la normalización con *GAPDH*. Las diferencias más acusadas³⁵ se obtuvieron para los siguientes genes: **AATF** (*apoptosis antagonizing transcription factor*), **BNIP3** (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*), **DAPK1** (*death-associated protein kinase 1*), **GADD45A** (*growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*), **NDRG1** (*N-myc downstream regulated gene*), **SHC1** (*SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1*) y **EGFR** (*epidermal growth factor receptor*). Los ratios de sobre-expresión génica entre los CNMPs/CCRs y el P valor asociado al análisis se detallan en la siguiente tabla (**Tabla 3.26**).

³⁵ Sobre-expresión significativa y superior al menos seis veces, en los CNMPs vs. CCRs, con acortamiento telomérico.

| MATRIZ DE OLIGO-NUCLEÓTIDOS | GENES | REFERENCIA GeneBank | RATIO DE SOBRE-EXPRESIÓN CNMPs/CCRs | P |
|--|----------------|---------------------|-------------------------------------|---------|
| <i>Oligo GEArray® Human p53 Signaling Pathway Microarray</i> | <i>AATF</i> | NM_012138 | 6.23 | < 0.001 |
| | <i>BNIP3</i> | NM_04052 | 16.41 | < 0.001 |
| | <i>DAPK1</i> | NM_004938 | 25.38 | < 0.001 |
| | <i>GADD45A</i> | NM_001924 | 34.03 | 0.020 |
| | <i>NDRG1</i> | NM_006096 | 549.10 | < 0.001 |
| | <i>SHC1</i> | NM_003029 | 30.84 | 0.01 |
| <i>Oligo GEArray® Human Cancer PathwayFinder</i> | <i>EGFR</i> | NM_005228 | 19.30 | < 0.001 |

Tabla 3.26. Resultados del análisis comparativo de expresión con matrices de oligonucleótidos, entre los CNMPs vs. CCRs con acortamiento telomérico, tras la normalización con *GAPDH*.

3.3.2. Validación mediante PCR cuantitativa a tiempo real del ensayo de expresión génica con matrices de oligonucleótidos.

Los resultados de sobre-expresión génica para los siete genes arriba mencionados, en los CNMPs vs. CCRs con acortamiento telomérico, se validaron mediante la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Además, incluimos en el análisis a *TP53* (*tumour protein 53*) y a *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2*), por su importante papel en la senescencia y muerte celular.

Los valores de ΔCt^{36} ($Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{endógeno (GAPDH)}}$) de cada muestra se emplearon para comparar los niveles de expresión génica. Para cada gen, se comparó el valor medio de ΔCt en los CNMPs vs. CCRs, ambos con acortamiento telomérico, mediante la prueba t de Student, o la alternativa no paramétrica, en caso de ausencia de normalidad en la población. Para este análisis se consideraron todas las muestras de CNMP y CCR, objeto de estudio en esta Tesis (véase las características clínico-patológicas “Pacientes y muestras tisulares”), de las que se disponía la información relativa al estatus telomérico y del extracto de ARN en condiciones óptimas para el desarrollo de esta técnica.

³⁶ Nótese, para la interpretación de los resultados, que menores valores de Ct, se corresponden con mayor cantidad de molde, y por tanto, mayor actividad transcripcional del gen objeto de estudio.

En la siguiente tabla (**Tabla 3.27**) se detallan los resultados del análisis de expresión génica, mediante qRT-PCR, en los CNMPs *vs.* CCRs con acortamiento telomérico.

| GENES | REFERENCIA (<i>TaqMan® Gene Expression Assay 20X</i>) | TIPO TUMORAL | N | EXPRESIÓN (valor medio de $\Delta Ct \pm EE$) | P Y PRUEBA ESTADÍSTICA |
|----------------|--|-----------------|----|---|---|
| <i>AATF</i> | Hs00201719_m1 | CNMPs | 37 | 5.43 ± 0.15 | 0.213; t de Student |
| | | CCRs | 44 | 5.16 ± 0.15 | |
| <i>BNIP3</i> | Hs00969291_m1 | CNMPs | 37 | 3.95 ± 0.22 | P < 0.001; t de Student |
| | | CCRs | 44 | 7.22 ± 0.21 | |
| <i>DAPK1</i> | Hs00234489_m1 | CNMPs | 39 | 5.75 ± 0.32 | 0.001; t de Student |
| | | CCRs | 44 | 7.06 ± 0.17 | |
| <i>GADD45A</i> | Hs99999173_m1 | CNMPs | 39 | 6.90 ± 0.25 | 0.003; U de Mann-Whitney |
| | | CCRs | 44 | 7.78 ± 0.19 | |
| <i>NDRG1</i> | Hs00608389_m1 | CNMPs | 37 | 1.94 ± 0.24 | P < 0.001; t de Student |
| | | CCRs | 44 | 3.53 ± 0.17 | |
| <i>SHC1</i> | Hs00427539_m1 | CNMPs | 39 | 3.67 ± 0.20 | 0.051; t de Student |
| | | CCRs | 44 | 4.14 ± 0.14 | |
| <i>EGFR</i> | Hs01076091_m1 | CNMPs | 36 | 4.58 ± 0.32 | P < 0.001; U de Mann-Whitney |
| | | CCRs | 42 | 5.96 ± 0.17 | |
| <i>TP53</i> | Hs00153340_m1 | CNMPs | 40 | 5.33 ± 0.16 | P < 0.001; U de Mann-Whitney |
| | | CCRs | 44 | 4.36 ± 0.21 | |
| <i>CDKN2A</i> | Hs00923894_m1 | CNMPs | 37 | 5.05 ± 0.35 | P < 0.001; t de Student |
| | | CCRs | 44 | 7.15 ± 0.24 | |

Tabla 3.27. Resultados del análisis de expresión génica entre los CNMPs *vs.* CCRs, con acortamiento telomérico, tras la normalización con *GAPDH* (Hs99999905_m1), mediante qRT-PCR.

_m: la sonda reconoce uniones exón-exón, evitando la amplificación de ADN genómico; Hs: *Homo sapiens*; N: número de casos. EE: error estándar.

Al comparar los datos de expresión obtenidos en CNMP y en CCR, ambos con acortamiento telomérico, se constata la sobre-expresión de *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *EGFR* y *CDKN2A* en los CNMPs, respecto a los carcinomas colorrectales. En el caso de *SHC1*, hallamos diferencias próximas a la significación estadística ($P = 0.051$; t de Student) entre el nivel medio de expresión en los CNMPs en relación a los CCRs, ambos con acortamiento telomérico. Respecto a *TP53*, los resultados de qRT-PCR evidencian una actividad transcripcional significativamente mayor en los CCRs con acortamiento telomérico. Finalmente, los niveles de expresión de *AATF* no fueron estadísticamente diferentes entre ambos tipos tumorales.

Además, para los CNMPs y CCRs el valor de expresión de cada gen en la muestra tumoral, se comparó con el valor de expresión de dicho gen en la muestra calibradora³⁷, ambos referenciados respecto a la expresión de *GAPDH*, obteniéndose de este modo el valor de $\Delta\Delta Ct$. El valor medio de $\Delta\Delta Ct$ o RQ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de cada gen se comparó entre los CNMPs *vs.* CCRs, con acortamiento telomérico (Tabla 3.28 y Figura 3.24). Para la muestra calibradora, el valor de RQ (*relative quantification*) es 1. Los valores de RQ comprendidos entre 0.5 y 2 implican que el nivel de expresión del gen objeto de estudio en la muestra tumoral es similar al nivel de expresión de dicho gen en el calibrador. Los datos de RQ superiores a 2 o inferiores a 0.5 suponen, respectivamente, una sobre-expresión o una expresión disminuida del gen objeto de estudio en la muestra tumoral, respecto al calibrador.

| GENES | TIPO TUMORAL | N | EXPRESIÓN (valor medio de $\Delta\Delta Ct \pm EE$) | P Y PRUEBA ESTADÍSTICA | EXPRESIÓN (valor medio de RQ $\pm EE$) | P Y PRUEBA ESTADÍSTICA |
|----------------|--------------|----|---|---------------------------|--|---------------------------|
| <i>AATF</i> | CNMPs | 37 | 1.13 \pm 0.15 | < 0.001 ^b | 0.55 \pm 0.06 | < 0.001 ^a |
| | CCRs | 44 | -0.29 \pm 0.12 | | 1.41 \pm 0.12 | |
| <i>BNIP3</i> | CNMPs | 37 | 0.42 \pm 0.17 | 0.032 ^b | 0.94 \pm 0.12 | 0.091 ^a |
| | CCRs | 44 | 1.04 \pm 0.23 | | 0.79 \pm 0.11 | |
| <i>DAPK1</i> | CNMPs | 39 | 3.41 \pm 0.32 | < 0.001 ^b | 0.30 \pm 0.13 | < 0.001 ^a |
| | CCRs | 44 | 1.53 \pm 0.17 | | 0.47 \pm 0.06 | |
| <i>GADD45A</i> | CNMPs | 39 | 2.03 \pm 0.28 | 0.005 ^a | 0.45 \pm 0.08 | 0.005 ^a |
| | CCRs | 44 | 0.93 \pm 0.15 | | 0.68 \pm 0.08 | |
| <i>NDRG1</i> | CNMPs | 37 | 1 \pm 0.25 | 0.742 ^b | 0.79 \pm 0.12 | 0.887 ^a |
| | CCRs | 44 | 0.89 \pm 0.16 | | 0.74 \pm 0.11 | |
| <i>SHC1</i> | CNMPs | 39 | 1.39 \pm 0.21 | 0.001 ^b | 0.57 \pm 0.09 | 0.001 ^a |
| | CCRs | 44 | 0.49 \pm 0.12 | | 0.84 \pm 0.07 | |
| <i>EGFR</i> | CNMPs | 36 | 0.86 \pm 0.32 | 0.960 ^b | 1.32 \pm 0.38 | 0.822 ^a |
| | CCRs | 42 | 0.87 \pm 0.16 | | 0.71 \pm 0.09 | |
| <i>TP53</i> | CNMPs | 40 | 1.41 \pm 0.15 | < 0.001 ^a | 0.49 \pm 0.07 | < 0.001 ^a |
| | CCRs | 44 | 0.41 \pm 0.2 | | 1.13 \pm 0.13 | |
| <i>CDKN2A</i> | CNMPs | 37 | -1.23 \pm 0.34 | 0.370 ^b | 5.48 \pm 1.19 | 0.401 ^a |
| | CCRs | 44 | -1.59 \pm 0.23 | | 5.24 \pm 0.89 | |

Tabla 3.28. Resultados del análisis de expresión génica entre los CNMPs *vs.* CCRs, con acortamiento telomérico, considerando los valores relativos de expresión, respecto a *GAPDH* y los grupos calibradores, mediante qRT-PCR. N: número de casos; ^a: U de Mann-Whitney; ^b: t de Student; EE: error estándar.

³⁷ La muestra calibradora está integrada por dieciséis muestras no tumorales, procedentes de 16 pacientes afectados de CNMP, y por un grupo de siete muestras no tumorales de siete pacientes afectados de CCR.

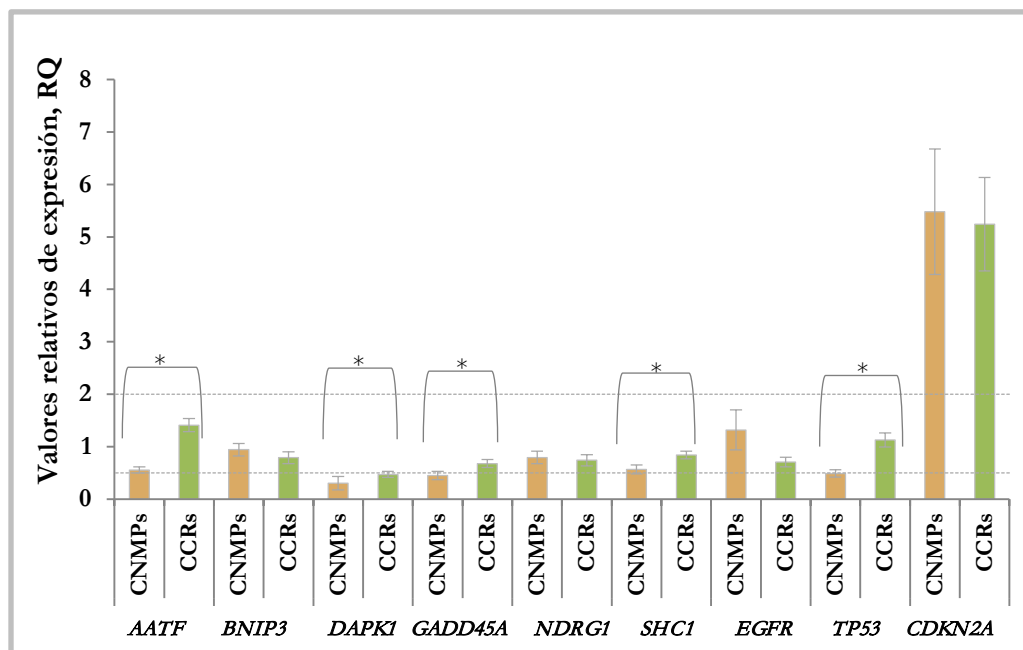


Figura 3.24. Valores relativos de expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* en los CNMPs y CCRs, con acortamiento telomérico. *: Resultados significativos.

Cuando el nivel de expresión de los nuevos genes incluidos en la tabla (**Tabla 3.28**) se relativiza respecto al grupo de muestras no tumorales, se observó que para *AATF*, *DAPK1*, *GADD45A*, *SHC1* y *TP53* la expresión relativa se enmarca en el intervalo de expresión considerado como *normal* en los CCRs, con cualquier grado de acortamiento telomérico. Sin embargo, en el caso de los CNMPs, los valores de RQ se sitúan bajo el límite de la normalidad.

A continuación, decidimos particularizar los resultados del análisis de expresión génica para cada tipo tumoral objeto de estudio de esta Tesis, en relación al estatus telomérico, la actividad telomerasa y las variables clínico-patológicas.

3.4. Expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral en los CNMPs.

3.4.1. La expresión génica y el estatus telomérico.

Con el fin de justificar bajo una perspectiva molecular el diferente pronóstico clínico que confiere el estatus telomérico en los CNMPs, exploramos la posible asociación existente entre el nivel de expresión de los genes seleccionados y la longitud de los telómeros.

Se consideraron los valores de expresión de los nueve genes objeto de estudio para cada una de las muestras de CNMP, respecto a los de la muestra calibradora, en ambos casos normalizados en relación a *GAPDH*. Los valores se presentan como $\Delta\Delta C_t$, o RQ (*relative quantification*, $2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Considerando los estudios de pronóstico basados en la función telomérica (3.1.5. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (II)), el punto de corte óptimo (en relación a la longitud telomérica media tumoral, LTMT) que nos permitió discriminar entre dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico, se sitúa en 3.295 Kb. Las curvas de supervivencia entre ambos grupos (LTMT > 3.295 Kb *vs.* LTMT < 3.295 Kb) mostraron diferencias próximas a la significación estadística ($P = 0.054$; Log-Rank). Una LTMT < 3.295 Kb resultó ser un factor protector independiente del estadio tumoral ($P = 0.041$; análisis multivariante de Cox) y de la diseminación del tumor a los ganglios linfáticos ($P = 0.045$; análisis multivariante de Cox).

Para conocer si existe, o no, una base molecular que sustenta estas diferencias halladas en relación al pronóstico clínico, comparamos el perfil de expresión de los genes seleccionados, entre los CNMPs con una LTMT < 3.295 Kb *vs.* LTMT > 3.295 Kb (**Tabla 3.29**)³⁸.

³⁸ Formaron parte de este estudio los mismos casos seleccionados para el estudio de pronóstico (3.1.5. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (II)) y de los que se disponía de la información relativa a la expresión de los 9 genes objeto de estudio, mediante qRT-PCR.

| GENES | ESTATUS TELOMÉRICO | N | EXPRESIÓN ¹ ($\Delta\Delta Ct \pm EE$) | P; t de Student | EXPRESIÓN ² ($RQ \pm EE$) | P; U de Mann-Whitney |
|----------------|-----------------------|----|--|--------------------|---|-------------------------|
| <i>AATF</i> | LTMT < 3.295 Kb | 18 | 1.1 ± 0.23 | 0.70 | 0.59 ± 0.1 | 0.49 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 27 | 0.99 ± 0.14 | | 0.58 ± 0.06 | |
| <i>BNIP3</i> | LTMT < 3.295 Kb | 18 | 0.46 ± 0.20 | 0.62 | 0.86 ± 0.12 | 0.58 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 27 | 0.31 ± 0.20 | | 1.02 ± 0.15 | |
| <i>DAPK1</i> | LTMT < 3.295 Kb | 21 | 3.32 ± 0.46 | 0.22 | 0.39 ± 0.22 | 0.1 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 27 | 2.62 ± 0.35 | | 0.33 ± 0.09 | |
| <i>GADD45A</i> | LTMT < 3.295 Kb | 21 | 2 ± 0.37 | 0.35 | 0.47 ± 0.12 | 0.37 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 27 | 1.53 ± 0.33 | | 0.62 ± 0.13 | |
| <i>NDRG1</i> | LTMT < 3.295 Kb | 18 | 0.96 ± 0.39 | 0.78 | 0.86 ± 0.19 | 0.47 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 27 | 1.07 ± 0.22 | | 0.62 ± 0.09 | |
| <i>SHC1</i> | LTMT < 3.295 Kb | 21 | 1.41 ± 0.30 | 0.35 | 0.59 ± 0.14 | 0.21 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 27 | 1.04 ± 0.26 | | 0.72 ± 0.15 | |
| <i>EGFR</i> | LTMT < 3.295 Kb | 18 | 1.25 ± 0.47 | 0.75 | 0.95 ± 0.34 | 0.63 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 26 | 1.08 ± 0.30 | | 1.06 ± 0.47 | |
| <i>TP53</i> | LTMT < 3.295 Kb | 21 | 1.40 ± 0.24 | 0.14 | 0.53 ± 0.12 | 0.08 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 27 | 0.94 ± 0.19 | | 0.72 ± 0.17 | |
| <i>CDKN2A</i> | LTMT < 3.295 Kb | 18 | -1.08 ± 0.46 | 0.95 | 4.43 ± 1.31 | 0.89 |
| | LTMT > 3.295 Kb | 27 | -1.05 ± 0.36 | | 4.38 ± 1.10 | |

Tabla 3.29. Expresión génica relativa de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* en los CNMPs con una longitud telomérica media (LTM) < 3.295 Kb vs. LTMT > 3.295 Kb. LTMT: longitud telomérica media en el tumor; ¹: Valor medio de $\Delta\Delta Ct \pm$ error estándar; ²: Valor medio de $RQ \pm$ error estándar; EE: error estándar; N: número de casos.

A la vista de los resultados expuestos en la tabla anterior (**Tabla 3.29**) podemos afirmar que, para los nueve genes objeto de estudio, la diferencia de expresión entre los CNMPs y el calibrador es similar en ambas subpoblaciones ($P > 0.05$; t de Student y U de Mann-Whitney). Por tanto, el pronóstico clínico distintivo que confiere el estatus telomérico entre estas subpoblaciones, no puede justificarse por una expresión diferencial de los genes analizados en esta serie de tumores.

La exclusión de los casos con telómeros críticamente cortos en la muestra tumoral y un *controvertido* buen pronóstico, nos permitió identificar dos nuevas subpoblaciones en base a la longitud telomérica media en el tumor (LTMT), con distinta evolución clínica. Un subgrupo de pacientes con una LTMT comprendida entre 3.295 y 5.205 Kb con un pronóstico clínico adverso, y otra subpoblación con una LTMT superior a 5.205 Kb y una evolución claramente más favorable (3.1.5. Estudios de pronóstico

basados en la función telomérica (II)). Comparamos el perfil de expresión de los genes seleccionados, entre los CNMPs con una LTMT comprendida entre 3.295 y 5.205 Kb *vs.* LTMT superior a 5.205 Kb (**Tabla 3.30**), para examinar si existían diferencias entre ambos grupos objeto de estudio, en relación a la expresión de estos genes³⁹.

| GENES | ESTATUS TELOMÉRICO | N | EXPRESIÓN ¹ ($\Delta\Delta Ct \pm EE$) | P | EXPRESIÓN ² ($RQ \pm EE$) | P |
|----------------|-----------------------|----|--|-------------------------|---|--------------------------|
| <i>AATF</i> | LTMT 3.295-5.205 Kb | 11 | 1.37 ± 0.19 | 0.01^a | 0.42 ± 0.04 | 0.02^a |
| | LTMT > 5.205 Kb | 16 | 0.73 ± 0.18 | | 0.69 ± 0.1 | |
| <i>BNIP3</i> | LTMT 3.295-5.205 Kb | 11 | 0.38 ± 0.31 | 0.8 ^b | 1 ± 0.03 | 0.93 ^b |
| | LTMT > 5.205 Kb | 16 | 0.27 ± 0.26 | | 1.03 ± 0.16 | |
| <i>DAPK1</i> | LTMT 3.295-5.205 Kb | 11 | 3.51 ± 0.51 | 0.03^b | 0.14 ± 0.04 | 0.048^a |
| | LTMT > 5.205 Kb | 16 | 2 ± 0.43 | | 0.47 ± 0.14 | |
| <i>GADD45A</i> | LTMT 3.295-5.205 Kb | 11 | 1.92 ± 0.48 | 0.34 ^b | 0.39 ± 0.08 | 0.35 ^a |
| | LTMT > 5.205 Kb | 16 | 1.26 ± 0.45 | | 0.77 ± 0.21 | |
| <i>NDRG1</i> | LTMT 3.295-5.205Kb | 11 | 1.17 ± 0.47 | 0.62 ^a | 0.68 ± 0.18 | 0.62 ^a |
| | LTMT > 5.205 Kb | 16 | 1 ± 0.20 | | 0.58 ± 0.08 | |
| <i>SHC1</i> | LTMT 3.295-5.205 Kb | 11 | 1.42 ± 0.35 | 0.23 ^b | 0.46 ± 0.07 | 0.2 ^a |
| | LTMT > 5.205 Kb | 16 | 0.78 ± 0.36 | | 0.89 ± 0.24 | |
| <i>EGFR</i> | LTMT 3.295-5.205 Kb | 10 | 1.48 ± 0.52 | 0.29 ^a | 0.72 ± 0.35 | 0.29 ^a |
| | LTMT > 5.205 Kb | 16 | 0.83 ± 0.35 | | 1.27 ± 0.73 | |
| <i>TP53</i> | LTMT 3.295-5.205 Kb | 11 | 1.26 ± 0.26 | 0.15 ^a | 0.51 ± 0.11 | 0.15 ^a |
| | LTMT > 5.205Kb | 16 | 0.71 ± 0.26 | | 0.86 ± 0.27 | |
| <i>CDKN2A</i> | LTMT 3.295-5.205 Kb | 11 | -0.76 ± 0.56 | 0.51 ^b | 3.61 ± 1.79 | 0.52 ^a |
| | LTMT > 5.205 Kb | 16 | -1.25 ± 0.48 | | 4.91 ± 1.43 | |

Tabla 3.30. Expresión génica relativa de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* en los CNMPs con una longitud telomérica media de 3.295 – 5.205 Kb *vs.* LTMT > 5.205 Kb.

LTMT: longitud telomérica media en el tumor; ¹: Valor medio de $\Delta\Delta Ct \pm$ error estándar; ²: Valor medio de $RQ \pm$ error estándar; EE: error estándar; N: número de casos; ^a: U de Mann-Whitney; ^b: t de Student.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla (**Tabla 3.30**), para *AATF* y *DAPK1* la diferencia media de expresión entre los tumores y el grupo de muestras no tumorales, fue significativamente más acusada ($P = 0.01$ y 0.03 , respectivamente) en

³⁹ Formaron parte de este análisis los mismos casos seleccionados para el estudio de pronóstico (3.1.5. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica (II)) y de los que se disponía de la información relativa a la expresión de los 9 genes evaluados.

los CNMPs con una LTMT comprendida entre 3.295 y 5.205 Kb ($\Delta\Delta C_t$ medio: 1.37 ± 0.19 y 3.51 ± 0.51 , para *AATF* y *DAPK1*, respectivamente), respecto a los CNMPs incluidos en el otro grupo ($\Delta\Delta C_t$ medio: 0.73 ± 0.18 y 2 ± 0.43 , para *AATF* y *DAPK1*, respectivamente).

Así pues, considerando los valores de RQ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), (**Figura 3.25**), podemos afirmar que, tanto para *AATF* como para *DAPK1*, su nivel relativo de expresión se halla bajo el límite de la normalidad ($RQ < 0.5$) en los CNMPs con una LTMT comprendida entre 3.295 y 5.205 Kb (RQ medio: 0.42 ± 0.04 y 0.14 ± 0.04 , para *AATF* y *DAPK1*, respectivamente). Sin embargo, para los CNMPs con telómeros más largos, el nivel relativo de expresión aumenta (RQ medio: 0.69 ± 0.1 y 0.47 ± 0.14 , para *AATF* y *DAPK1*, respectivamente) y se incluye en el intervalo definido como normal (RQ : $0.5 - 2$) en el caso de *AATF*.

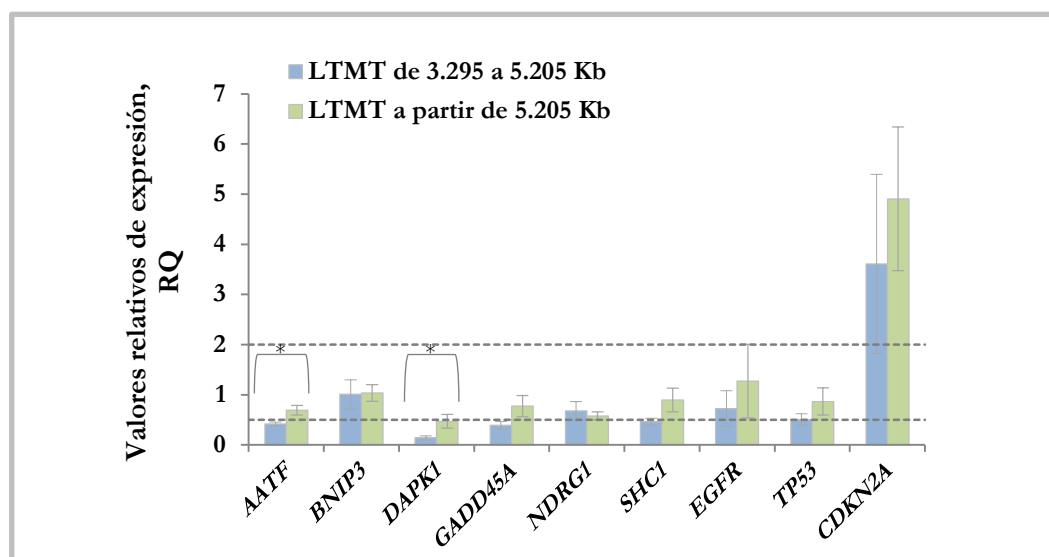


Figura 3.25. Valores relativo de expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* en los CNMPs con una LTMT de 3.295 – 5.205 Kb vs. CNMPs con LTMT > 5.205 Kb.

LTMT: longitud telomérica media tumoral; *: diferencias significativas.

Las acciones pro-apoptóticas de *DAPK1* están bien definidas, y a menudo se documenta su pérdida en los tumores (véase más adelante, apartado 4.4. Discusión). Con el fin de ahondar en la relación existente entre la longitud telomérica y la expresión de *DAPK1*, se seleccionaron cuatro muestras tumorales, con sus correspondientes controles, con el propósito de chequear los niveles de expresión de la proteína, y su concordancia, o no, con los niveles de ARNm. Dos de las muestras seleccionadas

se incluían en el grupo de tumores con una longitud telomérica media comprendida entre 3.295 – 5.205 Kb, y las otras dos, en el grupo de tumores con una longitud telomérica media superior a 5.205 Kb. Las características se detallan a continuación (**Tabla 3.31**).

| MUESTRA (ref. lab) | LTM CONTROL (Kb) | LTM TUMOR (Kb) |
|--------------------|------------------|----------------|
| 41 | 4.85 | 3.43 |
| 31 | 4.42 | 3.34 |
| 33 | 4 | 5.21 |
| 52 | 7.23 | 7.74 |

Tabla 3.31. Longitud telomérica media (LTM) en la muestra tumoral, y en el control de los casos seleccionados en el ensayo de Western-blot, para DAPK1. Ref. lab: referencia del laboratorio.

Los resultados obtenidos, aunque muy preliminares⁴⁰, parecen demostrar que, los tumores no microcíticos de pulmón con telómeros cortos (entre 3.295 – 5.205 Kb), muestran una expresión disminuida de la proteína pro-apoptótica DAPK1 (**Figura 3.26. a**). Mientras que aquellos tumores con telómeros largos, presentan niveles proteicos de DAPK1 similares, o incluso superiores, a los del tejido control (**Figura 3.26. b**).

⁴⁰ La gran cantidad de extracto proteico requerida para el ensayo de Western-blot resultó un factor limitante para la selección de las muestras que formaron parte del ensayo.

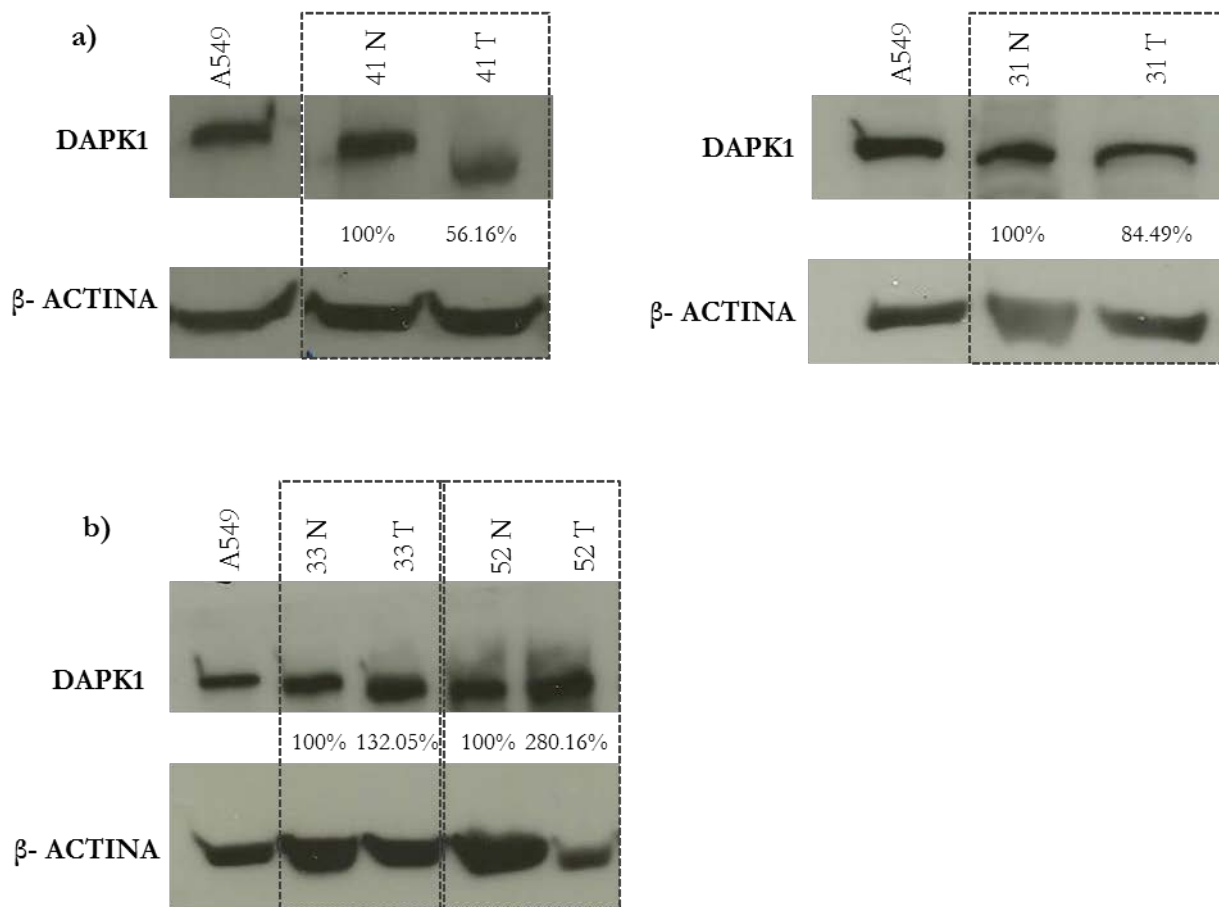


Figura 3.26. Análisis mediante Western-blot de DAPK1, en cuatro muestras de CNMP, y en sus controles: **a)** Muestras tumorales con una longitud telomérica media comprendida entre 3.295 – 5.205 Kb, con sus respectivos controles; **b)** Muestras tumorales con una longitud telomérica media superior a 5.205 Kb, con sus respectivos controles. Los porcentajes representan la expresión en el tumor, respecto al control, tras la normalización con β -actina.

Aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas en relación al nivel de expresión de *GADD45A*, *SHC1* y *TP53*, entre estos dos subgrupos definidos de acuerdo a la longitud telomérica media, nótese el aumento de expresión de estos genes en los CNMPs con una LTMT > 5.205 Kb, respecto a los CNMPs con LTMT comprendida entre 3.295 – 5.205 Kb (**Figura 3.25**). Los casos incluidos en este último subgrupo presentaron un nivel relativo de expresión bajo el límite de la normalidad; sin embargo para los CNMPs con una LTMT > 5.205Kb, el nivel de expresión de estos 3 genes se situaba en el intervalo de la normalidad.

3.4.2. La expresión génica y la actividad telomerasa.

A continuación evaluamos la posible asociación entre la actividad telomerasa y la expresión de los nueve genes seleccionados (**Tabla 3.32**). Formaron parte de este análisis todos los casos de los que se disponía la información relativa a la actividad telomerasa y a la expresión de los nueve genes objeto de estudio.

| GENES | ACTIVIDAD TELOMERASA | N | EXPRESIÓN ¹ ($\Delta\Delta C_t \pm EE$) | P | EXPRESIÓN ² ($RQ \pm EE$) | P; U de Mann-Whitney |
|----------------|-------------------------|----|---|--------------------|---|----------------------|
| <i>AATF</i> | NEGATIVA | 7 | 0.93 ± 0.47 | 0.63 ^a | 0.68 ± 0.15 | 0.63 |
| | POSITIVA | 56 | 0.97 ± 0.12 | | 0.62 ± 0.05 | |
| <i>BNIP3</i> | NEGATIVA | 7 | -0.24 ± 0.40 | 0.06 ^a | 1.44 ± 0.34 | 0.06 |
| | POSITIVA | 56 | 0.55 ± 0.14 | | 0.88 ± 0.09 | |
| <i>DAPK1</i> | NEGATIVA | 7 | 1.61 ± 0.78 | 0.09 ^b | 0.60 ± 0.20 | 0.1 |
| | POSITIVA | 58 | 2.92 ± 0.25 | | 0.34 ± 0.09 | |
| <i>GADD45A</i> | NEGATIVA | 7 | 1.72 ± 0.67 | 0.76 ^b | 0.52 ± 0.20 | 0.8 |
| | POSITIVA | 58 | 1.51 ± 0.23 | | 0.66 ± 0.11 | |
| <i>NDRG1</i> | NEGATIVA | 7 | 1.41 ± 0.23 | 0.4 ^b | 0.41 ± 0.06 | 0.27 |
| | POSITIVA | 56 | 0.96 ± 0.18 | | 0.74 ± 0.08 | |
| <i>SHC1</i> | NEGATIVA | 7 | 0.60 ± 0.23 | 0.103 ^b | 0.71 ± 0.10 | 0.24 |
| | POSITIVA | 58 | 1.12 ± 0.18 | | 0.70 ± 0.09 | |
| <i>EGFR</i> | NEGATIVA | 7 | 1.22 ± 0.82 | 0.63 ^a | 1.12 ± 0.62 | 0.65 |
| | POSITIVA | 55 | 1.10 ± 0.22 | | 0.98 ± 0.25 | |
| <i>TP53</i> | NEGATIVA | 7 | 1.10 ± 0.41 | 0.99 ^b | 0.57 ± 0.13 | 0.81 |
| | POSITIVA | 59 | 1.1 ± 0.14 | | 0.66 ± 0.09 | |
| <i>CDKN2A</i> | NEGATIVA | 7 | -1.05 ± 0.60 | 0.64 ^b | 3.65 ± 1.75 | 0.51 |
| | POSITIVA | 56 | -1.45 ± 0.29 | | 7.36 ± 1.57 | |

Tabla 3.32. Expresión relativa de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* en los CNMPs con actividad telomerasa positiva vs. actividad telomerasa negativa.

¹: Valor medio de $\Delta\Delta C_t \pm$ error estándar; ²: Valor medio de $RQ \pm$ error estándar; EE: error estándar; N: número de casos; ^a: U de Mann-Whitney; ^b: t de Student.

Los resultados recogidos en la tabla anterior (**Tabla 3.32**) no evidencian diferencias estadísticamente significativas en relación al nivel de expresión de los nueve genes objeto de estudio, entre los CNMPs con actividad telomerasa, respecto a los tumores carentes de ella. No obstante, aunque no se detectó asociación estadística, nótese la expresión aumentada de *BNIP3*, en los CNMPs sin actividad telomerasa, respecto a los tumores telomerasa positivos, con una diferencia en la expresión relativa próxima a la significación estadística ($P = 0.06$). En el caso de *DAPK1*, el valor relativo de expresión en los tumores sin actividad telomerasa (0.60 ± 0.20) duplicó al

detectado en los CNMPs con actividad telomerasa (0.34 ± 0.09), aunque no se detectaron diferencias significativas ($P = 0.1$).

3.4.3. La expresión génica y las variables clínico-patológicas.

Finalmente, analizamos si existía, o no, alguna diferencia entre las distintas categorías de las variables clínico-patológicas en relación al nivel relativo de expresión de los genes objeto de estudio, en los CNMPs.

Con respecto al estadio tumoral, el nivel relativo de expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* fue similar en todas las categorías (I, II, IIIA, IIIB y IV), ($P = 0.32, 0.17, 0.19, 0.18, 0.86, 0.13, 0.72, 0.18$ y 0.64 , respectivamente; prueba de Kruskal-Wallis). No obstante, la mayoría de los casos disponibles en la serie de 68 tumores considerados pertenecían al estadio I. Por ello, se comparó también el nivel relativo de expresión de estos nueve genes en los casos catalogados en el estadio I vs. el resto de estadios (II, IIIA, IIIB o IV). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, respecto a la expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, y *CDKN2A* ($P = 0.37, 0.63, 0.11, 0.085, 0.88, 0.28, 0.35$ y 0.58 , respectivamente; U de Mann-Whitney). Para el caso de *TP53*, el nivel relativo de expresión fue significativamente superior ($P = 0.015$; U de Mann-Whitney) en los tumores de estadio I (RQ: 0.76 ± 0.11) respecto a los CNMPs agrupados en estadios II, IIIA, IIIB o IV (RQ: 0.35 ± 0.04). Nótese que los niveles de expresión de *DAPK1* y *GADD45A* muestran diferencias, en relación al estadio tumoral, próximas a la significación estadística ($P = 0.11$ y 0.085 , respectivamente; U de Mann-Whitney), (**Figura 3.27**).

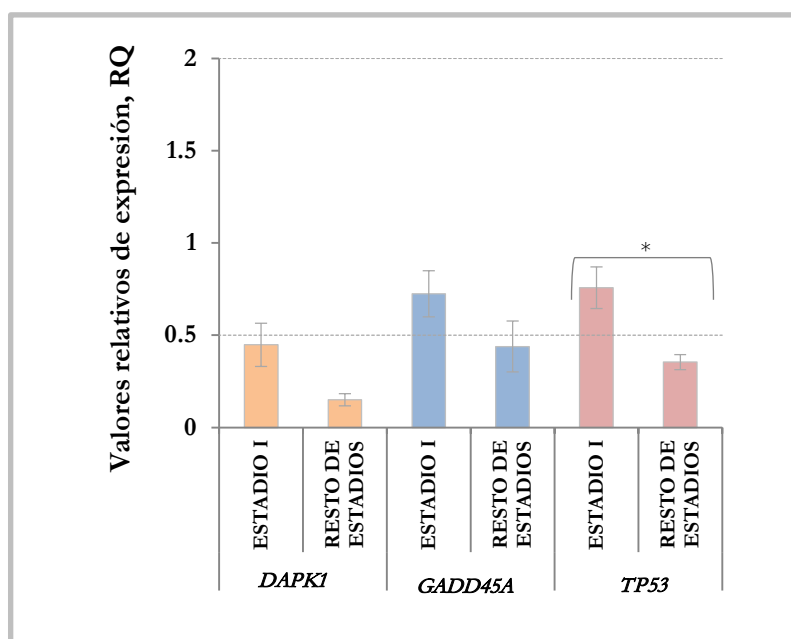


Figura 3.27. Valores relativos de expresión de *DAPK1*, *GADD45A* y *TP53* en relación al estadio tumoral. *: Resultado significativo.

Considerando la variable T, tumor primario, tampoco se hallaron diferencias significativas entre los grupos T1, T2, T3 y T4 y el nivel relativo de expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* ($P = 0.50$, 0.87 , 0.18 , 0.06 , 0.30 , 0.85 , 0.40 , 0.30 y 0.77 , respectivamente; prueba de Kruskal-Wallis). Para el caso de *GADD45A* se detectaron diferencias en la expresión próximas a la significación estadística ($P = 0.06$) entre las distintas categorías (**Figura 3.28**). Los tumores incluidos en la categoría T1 presentaron un nivel relativo de expresión de *GADD45A* superior, respecto a los tumores incluidos en los subgrupos T2, T3 o T4. La expresión de *GADD45A* disminuía a medida que aumentaba el tamaño del tumor.

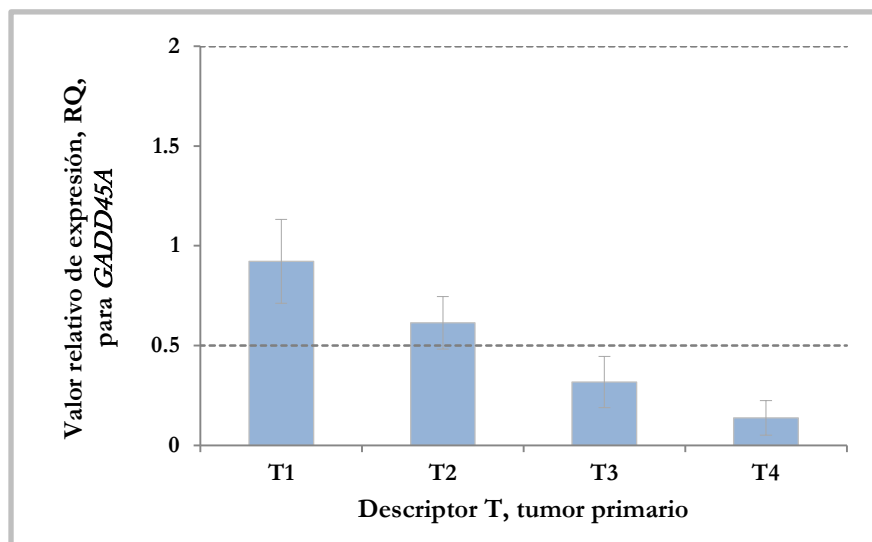


Figura 3.28. Valor relativo de expresión de *GADD45A* en relación a la variable T, tumor primario.

Los CNMPs de menor tamaño, T1, presentaron un nivel relativo de expresión significativamente superior de *DAPK1* ($P = 0.037$; U de Mann-Whitney), respecto a los tumores catalogados en los grupos T2, T3 o T4. No se hallaron diferencias significativas para *AATF*, *BNIP3*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* (0.39, 0.88, 0.08, 0.064, 0.41, 0.81, 0.91 y 0.71, respectivamente; U de Mann-Whitney) entre los CNMPs incluidos en el grupo T1 *vs.* el resto (T2, T3 o T4). No obstante, fueron interesantes los resultados hallados para *GADD45A* y *NDRG1* (Figura 3.29).

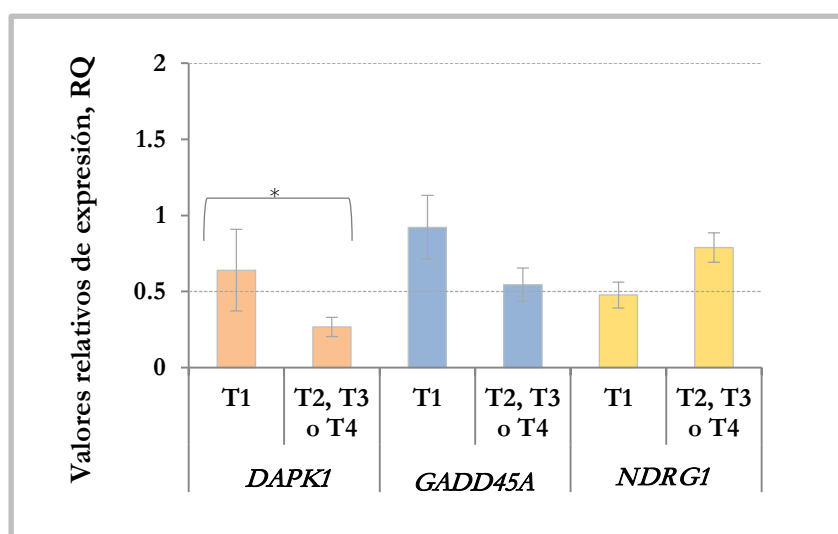


Figura 3.29. Valores relativos de expresión de *DAPK1*, *GADD45A* y *NDRG1* en relación al descriptor T, en los CNMPs.

*: Resultado significativo.

Los tumores clasificados como T1 presentaron niveles de expresión relativos de *GADD45A* superiores a los catalogados como T2, T3 o T4, aunque la diferencia de medias no alcanzó la significación estadística ($P = 0.08$; U de Mann-Whitney). En el caso de *NDRG1*, fueron los tumores clasificados como T2, T3 o T4 los que presentaron un mayor nivel de expresión y, sin embargo, en los tumores T1 el nivel relativo de expresión no alcanzó el intervalo considerado como *normal* ($P = 0.064$; U de Mann-Whitney), (**Figura 3.29**).

En relación al **grado de diseminación del tumor a los ganglios linfáticos, N**, no se detectaron diferencias en el nivel de expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* para las categorías N0, N1, N2 y N3 ($P = 0.63, 0.17, 0.35, 0.41, 0.56, 0.19, 0.80, 0.12$ y 0.33 , respectivamente; prueba de Kruskal-Wallis). Para este caso también examinamos si existían, o no, diferencias para el nivel relativo de expresión de estos genes entre los casos catalogados como N0 *vs.* cualquier grado de invasión ganglionar (N1, N2 o N3). No se obtuvieron diferencias significativas para *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, y *CDKN2A* ($P = 0.27, 0.11, 0.15, 0.22, 0.59, 0.052, 0.47$ y 0.17 , respectivamente; U de Mann-Whitney). Sin embargo, el nivel de expresión de *TP53* fue significativamente superior ($P = 0.021$; U de Mann-Whitney) en los casos en los que no se detectó invasión a los ganglios linfáticos (RQ: 0.72 ± 0.10) respecto a aquellos con cualquier grado de invasión ganglionar (RQ: 0.32 ± 0.04). También se hallaron resultados interesantes para *SHC1*: el nivel relativo de expresión fue superior en los CNMPs sin invasión ganglionar (RQ: 0.76 ± 0.1), y alcanzó niveles inferiores al intervalo asumido como *normal* (RQ: 0.45 ± 0.13) en los tumores que presentaron invasión a los ganglios linfáticos, (**Figura 3.30**).

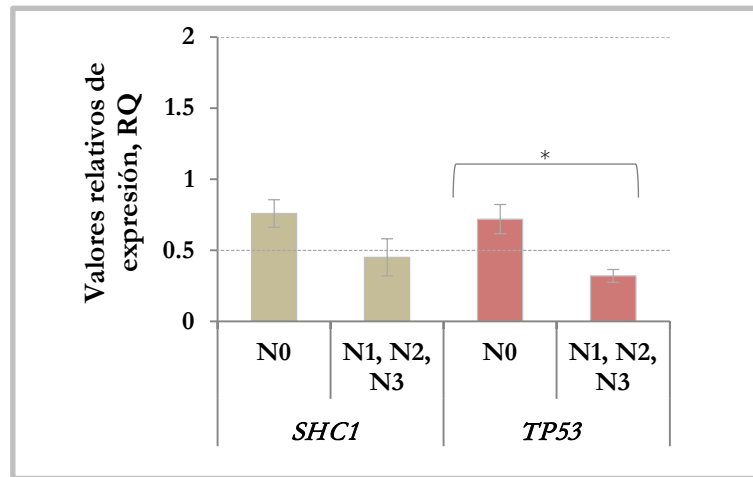


Figura 3.30. Valores relativos de expresión de *SHC1* y *TP53* en relación al grado de invasión ganglionar de los CNMPs. *: Resultado significativo.

El análisis comparativo entre el nivel de expresión de los nueve genes objeto de estudio y el **tipo histológico** de los tumores, mostró diferencias significativas para *AATF*, *DAPK1*, *GADD45A*, *SHC1* y *TP53*⁴¹ ($P = <0.001$, <0.001 , 0.01 , 0.004 y 0.005 , respectivamente; prueba de Kruskal-Wallis), (Tabla 3.33 y Figura 3.31).

| GENES | TIPO HISTOLÓGICO | N | EXPRESIÓN (RQ \pm EE) | P; Kruskal-Wallis |
|----------------|------------------------|----|-------------------------|-------------------|
| <i>AATF</i> | EPIDERMOIDE | 32 | 0.43 \pm 0.04 | <0.001 |
| | ADENOCARCINOMA | 26 | 0.77 \pm 0.09 | |
| | CARC. IND. CÉL. GRANDE | 4 | 1.23 \pm 0.13 | |
| <i>DAPK1</i> | EPIDERMOIDE | 33 | 0.10 \pm 0.02 | <0.001 |
| | ADENOCARCINOMA | 27 | 0.39 \pm 0.08 | |
| | CARC. IND. CÉL. GRANDE | 4 | 2.12 \pm 1 | |
| <i>GADD45A</i> | EPIDERMOIDE | 33 | 0.43 \pm 0.08 | 0.01 |
| | ADENOCARCINOMA | 27 | 0.74 \pm 0.16 | |
| | CARC. IND. CÉL. GRANDE | 4 | 1.65 \pm 0.84 | |

⁴¹ Existe además una correlación significativa (positiva, moderada a fuerte, según el caso), entre el nivel relativo de expresión de estos 5 genes ($P < 0.001$, en todos los casos).

| GENES | TIPO HISTOLÓGICO | N | EXPRESIÓN (RQ \pm EE) | P; Kruskal-Wallis |
|-------------|------------------------|----|-------------------------|-------------------|
| <i>SHC1</i> | EPIDERMÓIDE | 33 | 0.45 \pm 0.05 | 0.004 |
| | ADENOCARCINOMA | 27 | 0.88 \pm 0.16 | |
| | CARC. IND. CÉL. GRANDE | 4 | 1.60 \pm 0.40 | |
| <i>TP53</i> | EPIDERMÓIDE | 33 | 0.43 \pm 0.05 | 0.005 |
| | ADENOCARCINOMA | 28 | 0.83 \pm 0.17 | |
| | CARC. IND. CÉL. GRANDE | 4 | 1.21 \pm 0.46 | |

Tabla 3.33. Expresión génica relativa de *AATF*, *DAPK1*, *GADD45A*, *SHC1* y *TP53* en los CNMPs, en relación al tipo histológico.

Valor medio de RQ \pm error estándar; EE: error estándar; N: número de casos.

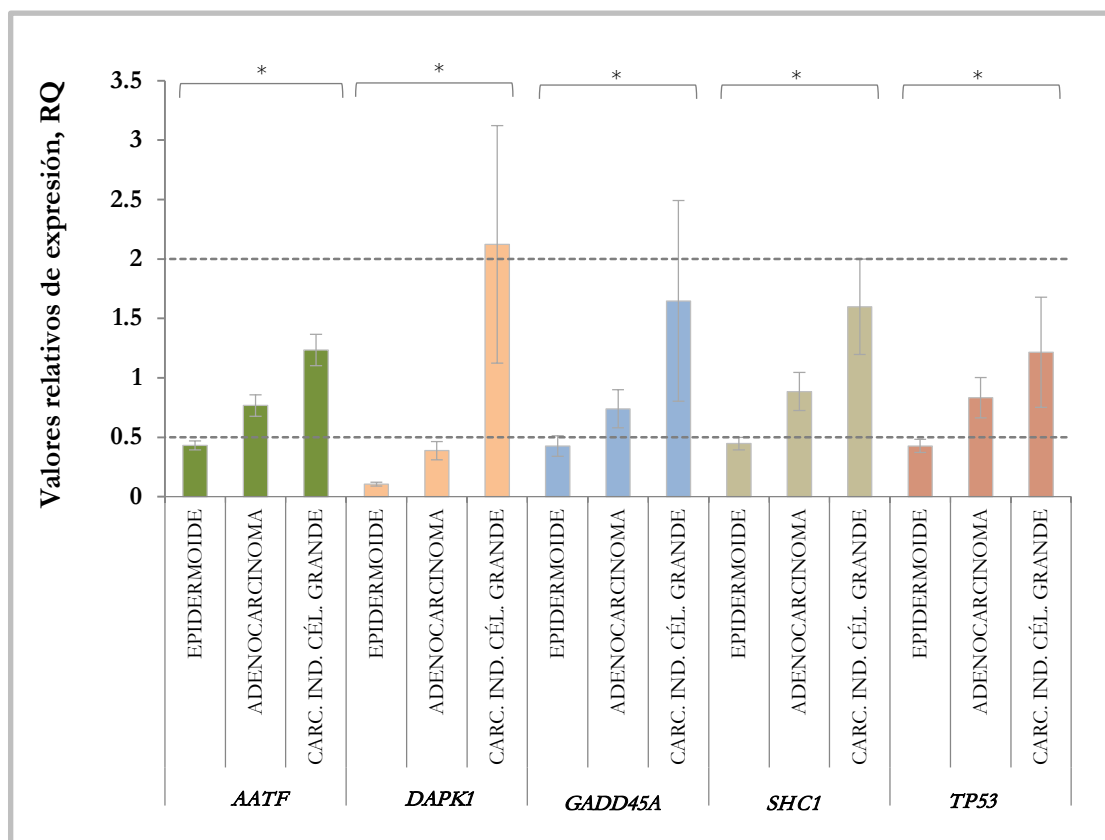


Figura 3. 31. Valores relativos de expresión de *AATF*, *DAPK1*, *GADD45A*, *SHC1* y *TP53* en los CNMPs, en relación al tipo histológico. *: Diferencias significativas.

De acuerdo a estos resultados, el nivel relativo de expresión de los 5 genes indicados fue significativamente superior en los carcinomas indiferenciados de célula grande. Este tipo histológico constituye un subgrupo minoritario en la serie investigada en la Tesis. Se detallan, a continuación, las características clínico-patológicas y de función telomérica para los cuatro casos clasificados en este tipo histológico (**Tabla 3.34**).

| VARIABLE | CASO 26 | CASO 37 | CASO 38 | CASO 67 |
|-------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| EDAD | 45 | 58 | 65 | 65 |
| SEXO | mujer | mujer | varón | varón |
| ESTADIO | I | I | I | I |
| T, tumor primario | T2 | T1 | T2 | T2 |
| N, invasión ganglionar | N0 | N0 | N0 | N0 |
| M, metástasis | ausencia | ausencia | ausencia | ausencia |
| RECURRENCIA | no | no | no | sí |
| ACTIVIDAD TELOMERASA | negativa | positiva | positiva | positiva |
| LONG. TELOMÉRICA MEDIA TUMOR (Kb) | 1.51 | 3.02 | * | 3.08 |
| LONG. TELOMÉRICA MEDIA CONTROL (Kb) | 5.97 | 3.53 | * | 5.28 |
| TRF T/TRF N | 0.25 | 0.85 | * | 0.58 |

Tabla 3.34. Características clínico-patológicas y de función telomérica de los carcinomas indiferenciados de célula grande. *: Datos no disponibles.

No se hallaron diferencias significativas para *BNIP3*, *NDRG1*, *EGFR* y *CDKN2A* ($P = 0.076, 0.15, 0.39$ y 0.15 , respectivamente; prueba de Kruskal-Wallis).

Por último, analizamos la posible relación entre el nivel de expresión de los nueve genes seleccionados y la **recurrencia en el proceso tumoral**. Se descarta la asociación entre el nivel relativo de expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *TP53* y *CDKN2A* ($P = 0.74, 0.62, 0.38, 0.99, 0.59, 0.27, 0.98$ y 0.65 , respectivamente; prueba de Kruskal-Wallis) y la recidiva. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas para *EGFR* ($P = 0.02$; prueba de Kruskal-Wallis), (**Figura 3.32**).

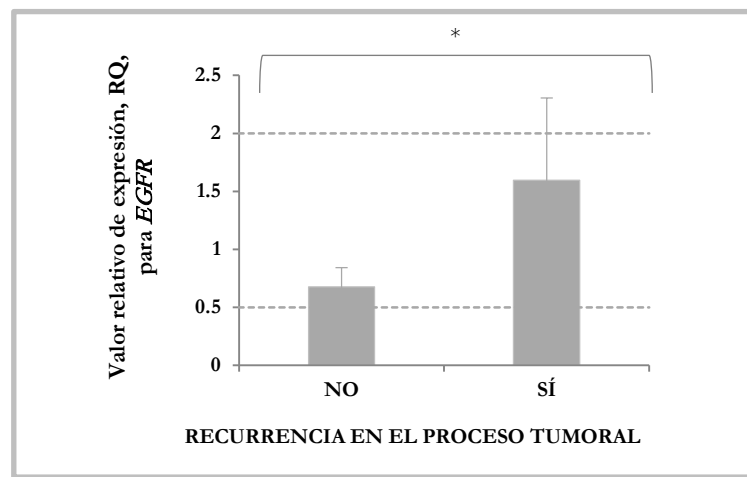


Figura 3.32. Valor relativo de expresión de *EGFR* en relación a la recurrencia en el proceso tumoral. *: Diferencias significativas.

3.5. Expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral en los CCRs.

3.5.1. La expresión génica y la actividad telomerasa⁴².

A continuación evaluamos la posible asociación entre la actividad telomerasa y la expresión de los nueve genes seleccionados (Tabla 3.35). Formaron parte de este análisis todos los casos de los que se disponía de la información relativa a la actividad telomerasa y a la expresión de los nueve genes objeto de estudio.

| GENES | ACTIVIDAD TELOMERASA | N | EXPRESIÓN ¹ ($\Delta\Delta C_t \pm EE$) | P | EXPRESIÓN ² ($RQ \pm EE$) | P; U de Mann-Whitney |
|----------------|-------------------------|----|---|--------------------------|---|----------------------|
| <i>AATF</i> | NEGATIVA | 7 | -0.82 ± 0.2 | 0.047^b | 1.88 ± 0.24 | 0.043 |
| | POSITIVA | 46 | -0.22 ± 0.11 | | 1.34 ± 0.12 | |
| <i>BNIP3</i> | NEGATIVA | 7 | 0.86 ± 0.59 | 0.655 ^b | 0.95 ± 0.42 | 0.862 |
| | POSITIVA | 46 | 1.14 ± 0.22 | | 0.72 ± 0.09 | |
| <i>DAPK1</i> | NEGATIVA | 7 | 1.21 ± 0.40 | 0.457 ^b | 0.56 ± 0.19 | 0.462 |
| | POSITIVA | 46 | 1.57 ± 0.18 | | 0.47 ± 0.06 | |
| <i>GADD45A</i> | NEGATIVA | 7 | 1.09 ± 0.45 | 0.650 ^b | 0.65 ± 0.22 | 0.636 |
| | POSITIVA | 46 | 0.89 ± 0.15 | | 0.7 ± 0.08 | |
| <i>NDRG1</i> | NEGATIVA | 7 | 0.33 ± 0.41 | 0.098 ^a | 1.10 ± 0.47 | 0.109 |
| | POSITIVA | 46 | 1.02 ± 0.17 | | 0.68 ± 0.09 | |
| <i>SHC1</i> | NEGATIVA | 7 | 0.51 ± 0.32 | 0.911 ^b | 0.82 ± 0.20 | 0.793 |
| | POSITIVA | 46 | 0.48 ± 0.11 | | 0.82 ± 0.06 | |
| <i>EGFR</i> | NEGATIVA | 7 | 0.44 ± 0.28 | 0.191 ^b | 0.85 ± 0.21 | 0.198 |
| | POSITIVA | 44 | 0.97 ± 0.15 | | 0.66 ± 0.08 | |
| <i>TP53</i> | NEGATIVA | 7 | 0.37 ± 0.39 | 1 ^a | 1.13 ± 0.21 | 0.636 |
| | POSITIVA | 46 | 0.42 ± 0.19 | | 1.08 ± 0.13 | |
| <i>CDKN2A</i> | NEGATIVA | 7 | -2.28 ± 0.65 | 0.315 ^b | 8.83 ± 3.78 | 0.386 |
| | POSITIVA | 46 | -1.63 ± 0.23 | | 5.28 ± 0.83 | |

Tabla 3.35. Expresión relativa de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* en los CCRs con actividad telomerasa positiva vs. actividad telomerasa negativa.

¹: Valor medio de $\Delta\Delta C_t \pm$ error estándar; ²: Valor medio de $RQ \pm$ error estándar; EE: error estándar; N: número de casos; ^a: U de Mann-Whitney; ^b: t de Student.

⁴² Los estudios de pronóstico realizados en la serie de 60 pacientes afectados de CCR, basados en la longitud telomérica, no permitieron discriminar entre dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico. Por ello no se particularizaron los análisis de expresión génica considerando esta variable.

Los resultados obtenidos sólo demuestran una asociación estadística entre la actividad telomerasa y el nivel relativo de expresión de *AATF*, que es significativamente superior en los tumores carentes de actividad telomerasa, respecto a los CCRs en los que sí se detectó actividad enzimática.

3.5.2. La expresión génica y las variables clínico-patológicas.

Del mismo modo que en el caso anterior, analizamos si existía, o no, alguna diferencia entre las distintas categorías de las variables clínico-patológicas en relación al nivel relativo de expresión de los genes objeto de estudio, en los CCRs.

Considerando el **estadio** tumoral, no se hallaron diferencias significativas entre los estadios A, B, C y D para el nivel relativo de expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* ($P = 0.840, 0.322, 0.072, 0.552, 0.602, 0.381, 0.781$ y 0.556 ; Kruskal-Wallis). Sí se detectaron diferencias significativas para el nivel relativo de expresión de *GADD45A* ($P = 0.043$; Kruskal-Wallis) entre los estadios A, B, C y D.

No se hallaron diferencias significativas entre el nivel relativo de expresión de los nuevos genes, entre los CCRs pertenecientes a los estadios A o B *vs.* C o D.

En relación a los descriptores **T** y **N**, el 66% de los casos de los que se disponía de la información relativa a la expresión génica pertenecían al grupo T3; y el 69.4% fueron incluidos en el grupo N0. Por lo tanto, considerando la homogeneidad de los grupos, no se realizó en este caso el análisis estadístico. De igual modo, el 91.5% de los casos, de los que se disponía de la información referente a la expresión génica, no recurrió en el proceso tumoral; tampoco se compararon los niveles relativos de expresión génica entre los casos con y sin recurrencia.

Por último, podemos descartar que exista una asociación estadística entre la **localización de los tumores colorrectales** y el nivel relativo de expresión de *AATF*, *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *SHC1*, *EGFR*, *TP53* y *CDKN2A* ($P = 0.222, 0.490, 0.714, 0.988, 0.201, 0.815, 0.827, 0.704$ y 0.656 ; Kruskal-Wallis).

4. Discusión

El acortamiento progresivo de los telómeros, en cada ciclo de división celular, representa una barrera fisiológica ante el cáncer. La continua erosión de los extremos cromosómicos va marcando la cuenta atrás de la vida de los cromosomas, hasta alcanzar una longitud crítica, que conduce a un estado de detención del ciclo celular. Se desencadena entonces la vía de respuesta al ADN dañado que conduce a la senescencia celular. Si nada se altera, las células pueden permanecer en este estado quiescente durante años. Sin embargo, las células tumorales humanas, derivadas de carcinomas, son capaces, de forma *cuasi* universal, de escabullirse de la senescencia celular y de los mecanismos de respuesta al ADN dañado. La afectación de válvulas de seguridad claves del ciclo celular, como p53, p16 o RB, otorga a las células pre-malignas el pasaporte para progresar, alcanzando finalmente el estado de crisis. Las fusiones de los extremos de los cromosomas, y otras aberraciones, conducen a un panorama celular caracterizado por la inestabilidad genómica y en último término tiene lugar la reactivación de la telomerasa. La telomerasa otorga a las células tumorales una importante ventaja selectiva: la *inmortalidad*. La disfunción telomérica es un evento frecuente en la mayoría de los cánceres humanos y son numerosos los trabajos que reconocen y validan el potencial clínico del estatus telomérico con carácter pronóstico. La actividad telomerasa se detecta aproximadamente en el 90% de los tumores malignos, convirtiéndola en un atractivo biomarcador, con valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico.

Los tumores sólidos, tales como los de pulmón y colorrectales, continúan afectando a millones de personas en todo el mundo. La identificación de nuevos biomarcadores para caracterizarlos constituye una estrategia fundamental para establecer el tratamiento inicial, la identificación de grupos de pacientes susceptibles de beneficiarse, o no, de una determinada terapia, y la posibilidad de predecir y monitorizar su respuesta a la misma. La catalogación de los tumores, basada sólo en sus características en el momento del diagnóstico (clasificación TNM), se hace en ocasiones insuficiente para predecir su respuesta a la terapia. Es necesario, por tanto, avanzar desde un determinismo temporal hacia un determinismo biológico que contemple, además, las características moleculares de los tumores y sus cambios en el tiempo.

Ahondar en el papel pronóstico de los telómeros, según el tipo tumoral considerado, y explorar la base molecular que lo sustenta, permitirá validar su potencial clínico como biomarcadores para guiar la terapia del cáncer.

4.1. La longitud telomérica y la actividad telomerasa en los CNMPs y CCRs.

La alteración de los telómeros en los tumores es un evento frecuente, bien por una pérdida acusada de las repeticiones teloméricas, bien por procesos de elongación, respecto al tejido control no tumoral (Aragona *et al.*, 2000) o por afectación del complejo *shelterin* (Frias *et al.*, 2012). La disfunción telomérica compromete la estabilidad genómica y conduce a distintos tipos de anormalidades, como la pérdida de heterozigosidad, el truncamiento de genes y aneuploidía (Callén y Surrallés, 2004 y Lundblad, 2001). En particular, la inmensa mayoría de las células tumorales humanas presentan telómeros de similar o inferior longitud que las células del tejido no tumoral adyacente (Hiyama, 2009), reflejo de su acusada historia proliferativa, de hecho, las enfermedades caracterizadas por una elevada tasa de replicación celular también exhiben esta marca característica, el acortamiento telomérico (Artandi y DePinho, 2010).

En las poblaciones de CNMP y CCR, objeto de estudio de esta Tesis, la longitud telomérica media resultó ser significativamente inferior en los tumores en relación a sus respectivas muestras control.

En las etapas tempranas de la carcinogénesis, los estímulos oncogénicos promueven la replicación del ADN provocando el acortamiento telomérico (Denko *et al.*, 1994; Bartkova *et al.*, 2006; Di Micco *et al.*, 2006; Halazonetis *et al.*, 2008 y Salon *et al.*, 2006). En la **carcinogénesis bronquial**, el **acortamiento telomérico** es un evento temprano, como lo constatan los trabajos desarrollados por la Doctora Sylvie Lantuejoul y cols., en lesiones bronquiales pre-invasivas (Lantuejoul *et al.*, 2005). Sin embargo, en CNMP no son muy abundantes los estudios pareados en los que se evalúe la longitud de los telómeros en las muestras tumorales y en los controles, no tumorales. Los estudios del Doctor Hsu y cols., en el ámbito de la función telomérica y la expresión de telomerasa, en pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón, ponen de manifiesto el acortamiento telomérico en los tejidos tumorales, respecto a los tejidos control no tumorales, exhibiendo diferencias estadísticamente significativas (Hsu *et al.*, 2006 y Hsu *et al.*, 2007). Nuestro grupo de investigación también constató este hecho (Frías *et al.*, 2008 y Fernández-Marcelo *et al.*, 2012).

En el **cáncer colorrectal** también se comprueba el **acortamiento telomérico** en los tumores, respecto a las muestras no tumorales de tejido adyacente, las lesiones pre-malignas y las lesiones inflamatorias (Engelhardt *et al.*, 1997). Diversos trabajos reflejan una longitud telomérica inferior en los tumores colorrectales, en relación a las muestras control, no tumorales (Gertler *et al.*, 2004 y Rampazzo *et al.*, 2010) y en

nuestro propio grupo de investigación también se han verificado estos resultados (García-Aranda *et al.*, 2006 y Fernández-Marcelo *et al.*, 2012).

En otros tipos tumorales, de igual modo se ha demostrado el acortamiento telomérico respecto a las muestras adyacentes no tumorales; como en los carcinomas mamarios (Odagiri *et al.*, 1994), en las neoplasias prostáticas intraepiteliales (Meeker *et al.*, 2002), en los tumores de cabeza y cuello (Patel *et al.*, 2002), etc.

Así pues, nuestros resultados, en consonancia con otros previos, demuestran la existencia de diferencias entre la longitud telomérica media en los CNMPs y CCRs, en relación a sus respectivas muestras control. Además, el cociente TRF T/TRF N refleja el grado de acortamiento telomérico en ambos tipos tumorales. No obstante, no debe obviarse que los telómeros también se acortan con el envejecimiento en los tejidos humanos, excepto en cerebro y corazón, con un carácter relativamente estático en cuanto a la renovación celular (revisado por Takubo *et al.*, 2010). Sí se tiene constancia del acortamiento telomérico en neuronas hipocampales de pacientes con la enfermedad de Alzheimer, en comparación a los individuos control (Franco *et al.*, 2006), y en pacientes con miocardiopatía dilatada, respecto a los controles sanos (Oh *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en esta Tesis para las poblaciones objeto de estudio, ponen de manifiesto que **la longitud telomérica en los CNMPs y CCRs está linealmente correlacionada con la longitud telomérica en el tejido control**. En nuestro grupo de investigación también se comprobó esto previamente, para ambos tipos tumorales (García-Aranda *et al.*, 2006 y Frías *et al.*, 2008). El trabajo del Doctor Ken-ichi Nakamura en una serie de ciento veinte y nueve pacientes afectados de cáncer colorrectal, reveló que la longitud telomérica en los tumores y en las muestras control se correlacionaba significativamente con la edad; las longitudes teloméricas de los tumores y los controles también se correlacionaban entre sí de manera significativa (Nakamura *et al.*, 2000). Por tanto, la longitud telomérica en los tumores resulta también afectada por la historia tisular, y por la capacidad proliferativa del tumor.

El acortamiento telomérico es un evento prevalente en las células proliferantes. En la mayoría de **los cánceres humanos la activación de telomerasa** es un sello distintivo, pues se trata de un mecanismo que permite la proliferación ilimitada de las células tumorales. Aunque acontece temprano en la carcinogénesis, no es necesaria para la iniciación del tumor. Sin embargo, puede estimular la progresión tumoral garantizando el mantenimiento telomérico por encima de una longitud crítica, evitando de este modo la senescencia celular o la apoptosis (revisado por Jesus y Blasco, 2013).

En la serie de tumores no microcíticos de pulmón, objeto de estudio en esta Tesis, se detectó actividad telomerasa en el 89.7% de los casos, concordante con otros re-

sultados previamente publicados por nuestro grupo (Frías *et al.*, 2008). Otros trabajos también constatan que en la mayoría de los cánceres de pulmón, la telomerasa está activada de manera aberrante (Lantuejoul *et al.*, 2004 y Lantuéjoul *et al.*, 2007).

Respecto a los tumores colorrectales, se detectó actividad telomerasa en cincuenta y uno de los sesenta casos objeto de estudio en esta Tesis, es decir, en el 85% de ellos. Estos resultados fueron muy cercanos a los previamente publicados por nuestro grupo de investigación (García-Aranda *et al.*, 2006), y por otros grupos (Engelhardt *et al.*, 1997 y Maláska *et al.*, 2004).

El específico patrón de expresión de la telomerasa en ambos tipos tumorales, y en otros tipos de cáncer, la convierte en una atractiva diana terapéutica. Algunos inhibidores de telomerasa, dirigidos a pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón, ya forman parte de ensayos clínicos. Entre ellos se incluyen el oligonucleótido antisentido GRN163L (*Imetelstat sodio*) y las vacunas peptídicas GV1001 y Vx-001 (Ruden y Puri, 2012). Respecto al carcinoma colorrectal, los ensayos *in-vitro* con líneas celulares, demuestran que el inhibidor de telomerasa GRN163L aumenta el efecto citotóxico de ciertos compuestos que dañan el ADN (Tamakawa *et al.*, 2010).

En un porcentaje minoritario de los cánceres humanos no se detecta actividad telomerasa, y un subgrupo de estos mantiene los telómeros mediante un mecanismo alternativo a la telomerasa (ALT). Este fenotipo ALT es relativamente común en ciertos sarcomas y astrocitomas. En las neoplasias de origen epitelial es poco frecuente (Heaphy *et al.*, 2011). Considerando los resultados obtenidos en las poblaciones de CNMP y CCR, analizadas en esta Tesis, el 10.3 y el 15% de los casos carecieron de actividad telomerasa. No es posible concluir si estos tumores recurren a mecanismos alternativos de mantenimiento telomérico, o directamente carecen de telomerasa y de cualquier estrategia semejante, pues la identificación del fenotipo ALT no se llevó a cabo para ninguna de las dos poblaciones. En cualquier caso, los mecanismos alternativos de mantenimiento telomérico deben ser cuidadosamente considerados puesto que pueden representar una forma de resistencia a la terapia anti-telomerasa.

Finalmente, debemos tratar el siguiente resultado que se verificó en las poblaciones de cáncer no microcítico de pulmón y colorrectal: la longitud telomérica media en las muestras tumorales, con actividad telomerasa, fue muy similar a la longitud determinada en las muestras carentes de actividad telomerasa. Resulta controvertida la coincidencia del acortamiento telomérico con la actividad telomerasa, pues ambos procesos acontecen en etapas tempranas de la transformación celular. Es plausible pensar que la actividad telomerasa garantice el mantenimiento, o incluso elongue, las secuencias teloméricas como en el tejido no tumoral. Sin embargo, es probable que la

actividad enzimática sea insuficiente al inicio del proceso tumorigénico, como para amortiguar la pérdida de secuencias teloméricas en cada ciclo de división celular. Como resultado los telómeros se acortan, y son parcialmente estabilizados cuando alcanzan longitudes críticas (revisado por Londoño-Vallejo, 2008).

4.2. La longitud telomérica, la actividad telomerasa y las variables clínico-patológicas en los CNMPs y CCRs.

En relación a la **carcinogénesis pulmonar**, son escasos los trabajos que evalúan la posible asociación existente entre el **estatus telomérico** y las **variables clínico-patológicas**.

Considerando la serie de pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón, los resultados obtenidos en esta Tesis no permiten establecer una asociación entre la longitud telomérica y las variables clínico-patológicas. Sin embargo, no debemos obviar que el acortamiento telomérico medio fue significativamente más acusado en el grupo de carcinomas indiferenciados de célula grande, respecto a los otros tipos histológicos y, además, la longitud telomérica media de este grupo fue notablemente inferior a la del resto de casos considerados. Los carcinomas indiferenciados de célula grande constituyen un tipo histológico minoritario, aproximadamente, suponen menos del 10% de la totalidad de los CNMPs (Rossi *et al.*, 2010) y en la serie objeto de estudio en esta Tesis, tan sólo están representados por tres casos. Por tanto, los resultados obtenidos deben ser validados en una población más amplia. No obstante, profundizar en el conocimiento de los distintos tipos y subtipos histológicos del cáncer de pulmón, contribuirá a la mejora en el diseño de terapias personalizadas, muchas de las cuales ya se asocian a ciertos tipos histológicos. Así, por ejemplo, los adenocarcinomas pulmonares responderían a la terapia con bevacizumab⁴³ (Kyle y Spicer, 2008), pero en el caso de los carcinomas epidermoides, la terapia con bevacizumab puede resultar peligrosa, pues se tiene constancia de que algunos pacientes han sufrido hemorragias severas que pueden llegar a poner en peligro su vida (revisado por Cagle *et al.*, 2011). Finalmente, en consonancia con los resultados obtenidos en esta Tesis, el trabajo del Doctor Hsu y cols. constata la ausencia de asociación entre la longitud telomérica media tumoral y el estadio, en el cáncer no microcítico de pulmón (Hsu *et al.*, 2004). Nuestro propio grupo de investigación tampoco halló una asociación estadística entre el estatus telomérico y el estadio TNM, en una serie de ochenta y tres pacientes afectados de CNMP (Frías *et al.*, 2008).

Los resultados son diversos acerca de la asociación entre las **variables clínico-patológicas** y el **estatus telomérico**, en los **cánceres colorrectales**.

El Doctor Ralf Gertler y cols. analizaron un grupo de 57 pacientes afectados de cáncer colorrectal, en el que los tumores catalogados en el estadio I (clasificados de

⁴³ Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF (*vascular endothelial growth factor*) dirigido a inhibir la angiogénesis tumoral.

acuerdo a la *International Union Against Cancer, UICC*) presentaron una longitud telomérica media significativamente inferior a la de los tumores de estadios más avanzados y, aunque no alcanzó la significación estadística, el valor del ratio de acortamiento telomérico aumentaba conforme lo hacía el estadio tumoral (Gertler *et al.*, 2004). En una publicación más antigua, la Doctora Monika Engelhardt y cols., demuestran que los tumores de estadios más avanzados (Dukes C y D) mostraron telómeros significativamente más largos que los de estadios más tempranos (Dukes A y B), (Engelhardt *et al.*, 1997). La justificación de estos hallazgos no debe desvincularse de la actividad telomerasa. Gertler y colaboradores muestran en su trabajo una clara tendencia: los niveles de expresión del ARN mensajero de *hTERT* aumentan a medida que lo hace la longitud telomérica en los carcinomas colorrectales, aumentando también la invasión local del tumor. Por lo tanto, es posible que la estabilización de los telómeros (mediada por la telomerasa) suceda tardíamente en la carcinogénesis colorrectal, tras una vasta proliferación celular (Gertler *et al.*, 2004). El trabajo de la Doctora García-Aranda y cols., en nuestro propio grupo de investigación, no valida esta asociación descrita entre el estadio y la longitud telomérica, en una población de noventa y un carcinomas colorrectales (García-Aranda *et al.*, 2006). En la serie de CCRs evaluada en esta Tesis tampoco se confirmaron esos hallazgos. En la misma publicación de la Doctora García-Aranda también se describe una asociación estadística entre la localización anatómica del tumor y el estatus telomérico; así pues, para los tumores localizados en el colon derecho, la longitud telomérica media fue significativamente inferior a la de los tumores con otras localizaciones (colon izquierdo y recto), (García-Aranda *et al.*, 2006). El grado de acortamiento telomérico también fue más acusado en los tumores localizados en el colon derecho respecto al resto de localizaciones. De igual modo, la Doctora Enrica Rampazzo y cols., encuentran diferencias en el estatus telomérico, de acuerdo a la localización anatómica del tumor, en una serie de ciento dieciocho pacientes con cáncer colorrectal (Rampazzo *et al.*, 2010). En la serie de tumores colorrectales evaluada en esta Tesis, no se detectaron diferencias en cuanto a la longitud telomérica media, en relación a la localización del tumor. Considerando el ratio de acortamiento telomérico, sí se hallaron diferencias significativas: respecto al tejido control, fue en los tumores localizados en el colon izquierdo donde se producía un acortamiento telomérico más acusado. Nótese que se evaluó un menor número de casos, comparado con el de las poblaciones tumorales analizadas en los trabajos anteriores, y que no existe un resultado consensuado a este respecto (Gertler *et al.*, 2004 y Tatsumoto *et al.*, 2000).

En relación a la posible asociación existente entre la presencia, o ausencia, de **actividad telomerasa** en la serie de **CNMPs** objeto de estudio, y las **variables clínico-patológicas** evaluadas, nuestros resultados no permiten establecer una relación estadística: la presencia de actividad telomerasa es una característica *cuasi universal*

entre las distintas categorías de las variables clínico-patológicas. Los trabajos que abordan este aspecto ofrecen resultados diversos, y consideran distintas aproximaciones para determinar la presencia y actividad de telomerasa, como el ensayo TRAP, la inmunohistoquímica, el *Western-blot*, etc. El estudio de la Doctora Lantuejoul y cols., en una serie de 122 muestras de cáncer de pulmón, que incluía a los tipos histológicos epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma basaloide y carcinoma de pulmón de células pequeñas, demuestra que la expresión de telomerasa varía de acuerdo al tipo histológico (Lantuejoul *et al.*, 2004). En esta misma publicación, los carcinomas de pulmón de estadio I muestran una actividad telomerasa (determinada por el ensayo TRAP e inmunohistoquímica) inferior a la de los casos incluidos en otros estadios (II-IV). En la publicación del Doctor Tzu-Chin Wu y cols., donde se analiza el mensajero de *hTERT* y la actividad telomerasa, mediante el ensayo TRAP, en una serie de 56 tumores de pulmón, que incluía a 34 adenocarcinomas y 22 carcinomas epidermoides, la presencia, o ausencia, del mensajero de *hTERT* no se asocia con ninguna variable clínico-patológica (sexo, edad, tamaño y grado de invasión del tumor, estadio, tipo histológico y hábito tabáquico), (Wu *et al.*, 2003). En este mismo estudio, la presencia, o ausencia, de actividad telomerasa tampoco se relaciona con ninguna de las variables clínico-patológicas mencionadas, excepto con la edad de los pacientes: la frecuencia de casos con actividad telomerasa fue superior en los individuos cuya edad excedía los 55 años. En nuestro propio grupo de investigación, en el trabajo de la Doctora Frías y cols., en una serie de 83 carcinomas no microcíticos de pulmón, sí se establece, sin embargo, una asociación estadísticamente significativa entre la actividad telomerasa y el estadio, tamaño y tipo histológico de los tumores (Frías *et al.*, 2008). La heterogeneidad de los resultados disponibles impone la necesidad de ampliar estos estudios para alcanzar datos consensuados.

Para los **carcinomas colorrectales**, nuestros resultados no confirman ninguna asociación estadística entre la **actividad telomerasa** y las **variables clínico-patológicas** consideradas. Aunque los trabajos publicados ofrecen resultados diversos, y consideran no sólo la actividad, sino también los niveles de ARN mensajero de *hTERT*. El trabajo de la Doctora Bertorelle y cols. demuestra que los niveles de mensajero de *hTERT* aumentan a medida que lo hace el estadio tumoral (Bertorelle *et al.*, 2013), y validan así resultados previos aportados por otros grupos (Terrin *et al.*, 2008 y Rampazzo *et al.*, 2010). En la misma publicación de la Doctora Bertorelle y cols., y en consonancia con el trabajo de la Doctora Rampazzo, en la serie de 137 tumores colorrectales analizada, no hallan una correlación entre los niveles del mensajero de *hTERT* y la localización del tumor. En una publicación previa, (Simsek *et al.*, 2010), la determinación por inmunohistoquímica de *hTERT* en una serie de 20 pólipos hiperplásicos, 20 pólipos adenomatosos, 20 adenocarcinomas y 20 muestras de tejido no

tumoral, reveló que la expresión de hTERT aumentaba conforme lo hacía el grado histológico. En el trabajo del Doctor Maláska y cols., sí se demuestra la existencia de diferencias estadísticamente significativas, en relación a la actividad telomerasa, considerando el grado de invasión del tumor a los ganglios linfáticos regionales: la actividad telomerasa es superior en las muestras tumorales con cualquier grado de invasión ganglionar (N1 o N2), respecto a las que carecen de metástasis a los ganglios linfáticos regionales (N0), (Maláska *et al.*, 2004). En nuestro propio grupo de investigación, los resultados expuestos en el trabajo de la Doctora García-Aranda y cols., en una serie de 91 carcinomas colorrectales, no se halló ningún tipo de asociación estadística entre la presencia, o ausencia, de actividad telomerasa y las variables clínico-patológicas evaluadas (sexo, edad, estadio tumoral, localización del tumor, grado de diferenciación y recurrencia en el proceso tumoral), (García-Aranda *et al.*, 2006). De nuevo, la diversidad de resultados disponibles hace que sea necesario consensuar los estudios, en relación a la determinación de la actividad telomerasa y su relación con las variables clínico-patológicas en el cáncer colorrectal.

4.3. Estudios de pronóstico basados en la función telomérica, en los CNMPs y CCRs.

El potencial **uso clínico del estatus telomérico para el establecimiento del pronóstico de los tumores sólidos**, así como de las leucemias, ha sido ampliamente considerado y continua siendo objeto de estudio en el ámbito de la oncología (Bisoffi *et al.*, 2006; Rampazzo *et al.*, 2012 y Roos *et al.*, 2008). Su valor predictivo, para evaluar el riesgo de padecer un proceso tumoral, u otra patología, y su evolución (Weischer *et al.*, 2013 y Fitzpatrick *et al.*, 2011) resulta también muy atractivo.

Aunque la disfunción telomérica es un evento frecuente en los tumores, los resultados acerca de su implicación en el pronóstico clínico de los pacientes con cáncer, resultan muy diversos. Respecto a los carcinomas mamarios, por ejemplo, la primera publicación que lo aborda (Odagiri *et al.*, 1994) no evidencia una correlación estadística entre la longitud telomérica y el tiempo de supervivencia, en la serie de cuarenta y un carcinomas mamarios analizada. Otros trabajos, en los que se evalúa el estatus telomérico, según el contenido en ADN telomérico, sí demuestran el valor pronóstico de los telómeros en el cáncer de mama (Griffith *et al.*, 1999b y Fordyce *et al.*, 2006). Las publicaciones más recientes tampoco están exentas de controversia. El trabajo del Doctor Lingeng Lu y cols., en una serie de 348 tumores mamarios, no muestra una relación entre la longitud telomérica, determinada por qPCR, y la evolución de la enfermedad (Lu *et al.*, 2011). No obstante, el estudio reciente de la Doctora Martínez-Delgado y cols., verifica la utilidad clínica de la disfunción telomérica en el cáncer de mama: esta se haya frecuentemente asociada a los tumores hereditarios, y puede representar un biomarcador informativo de su agresividad (Martinez-Delgado *et al.*, 2013).

En el cáncer de próstata, la disminución en el contenido de ADN telomérico se asocia con una peor evolución clínica de la enfermedad, así como con marcadores de progresión tumoral (Donaldson *et al.*, 1999 y Fordyce *et al.*, 2005). El reciente trabajo del Doctor Heaphy y cols. ratifica el uso de los telómeros como biomarcadores de pronóstico en el cáncer de próstata (Heaphy *et al.*, 2013). En otros tipos tumorales menos frecuentes, como los tumores de cabeza y cuello (Patel *et al.*, 2002), los neuroblastomas (Ohali *et al.*, 2006) y los glioblastomas (Torre *et al.*, 2011), también está extendido el análisis de los telómeros como herramienta de pronóstico.

Ahondar, por tanto, en el conocimiento del estatus telomérico con valor pronóstico e incorporarlo a la clínica, junto con los actuales, y no siempre perfectos, marca-

dores, permitirá la identificación de nuevos subgrupos de pacientes con distinta evolución clínica y susceptibles de recibir terapias personalizadas.

El presente estudio pretende contribuir a dilucidar el papel pronóstico de los telómeros en el CNMP y CCR. En ambos casos, las poblaciones iniciales objeto de estudio se incorporaron a las bases de datos de CNMP y CCR disponibles en nuestro propio grupo de investigación, con el fin de aumentar la potencia estadística. En las dos patologías se recurrió al uso de la aplicación electrónica *Cutoff Finder* (Budczies *et al.*, 2012) con el objetivo de optimizar la búsqueda de puntos de corte relativos al estatus telomérico, que discriminan entre dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico.

Para los **tumores no microcíticos de pulmón**, una **longitud telomérica** media inferior a 7.29 Kb, y casi cualquier grado de acortamiento telomérico ($TRFT/TRF\ N < 0.97$) en la muestra tumoral, respecto al tejido control, constituyen **factores de pronóstico** adverso, independientes del estadio y del grado de diseminación del tumor a los ganglios linfáticos. Así pues, considerando que en la serie de pacientes en la que se desarrolla este estudio, con más de 100 individuos, la longitud telomérica media en las muestras no tumorales se sitúa en torno a 6.99 Kb, podemos establecer que los enfermos con una longitud telomérica media tumoral inferior a la media de las muestras control, presentan un pronóstico clínico significativamente más adverso.

El estudio del estatus telomérico como factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de pulmón, aún sigue aportando resultados inconclusos (revisado por Lan *et al.*, 2013), pero resulta también un marcador atractivo para predecir el curso de la enfermedad, aunque son escasos los trabajos publicados al respecto. En una publicación pionera, el Doctor Shirotani y cols. demostraron que, en su serie de muestras analizada (46), la alteración telomérica sucedía tanto en el subgrupo de carcinomas de células pequeñas como en los adenocarcinomas (Shirotani *et al.*, 1994). Sin embargo, no fueron capaces de establecer una asociación clara entre este evento y el pronóstico de los pacientes. En un trabajo posterior, el Doctor Hirashima y cols. concluyeron que los pacientes con alteraciones en la longitud telomérica (elongación o reducción, definida según los límites establecidos en la publicación) tenían tiempos de supervivencia significativamente inferiores a los de los pacientes que carecían de estas alteraciones (Hirashima *et al.*, 2000). Cuatro años después de la anterior publicación, el Doctor Hsu y cols., evaluaron una serie de 79 pacientes afectados de CNMP, y concluyeron que la probabilidad de supervivencia a los cuatro años de la resección quirúrgica del tumor, era significativamente inferior para el subgrupo con un acortamiento telomérico más agudo en las células tumorales, respecto al tejido control (Hsu *et al.*, 2004). Nuestro propio grupo de investigación demostró que la probabilidad de recurrir en el proceso tumoral, tras la intervención quirúrgica, era significativamente

superior para los pacientes con cualquier grado de acortamiento telomérico en la muestra tumoral, respecto al tejido sano (Frías *et al.*, 2008). El trabajo más reciente que considera la longitud telomérica como herramienta para predecir el pronóstico de los pacientes intervenidos de CNMP, evalúa una serie de 164 sujetos y determina la longitud telomérica relativa de los tumores mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los pacientes categorizados en el cuartil con los telómeros más cortos, primer cuartil, mostraron un pronóstico clínico significativamente más adverso, respecto a los individuos clasificados en el segundo, tercer y cuarto cuartil, con telómeros más largos (Jeon *et al.*, 2012).

Así pues, los trabajos previos existentes en la bibliografía que han contemplado el valor pronóstico del estatus telomérico en el CNMP aún no ofrecen resultados concluyentes, y no adoptan criterios uniformes. Los iniciales, consideran de manera general alteraciones en la longitud telomérica media, por exceso o defecto, respecto a un intervalo definido como *normal*. Las publicaciones posteriores emplean como biomarcador el grado de acortamiento telomérico en el tumor, respecto al tejido control, no tumoral. Y el trabajo más reciente, obvia el estatus telomérico en el tejido sano, y sólo considera la longitud telomérica de los tumores. Además, a menudo el número de casos analizado es reducido e incluye a etnias muy concretas. Y aunque en general, la medida de la longitud de los fragmentos teloméricos se lleva a cabo empleando la técnica de *Southern-blot*, el trabajo más reciente recurre a la qPCR, y por tanto sólo es capaz de ofrecer valores relativos de la longitud telomérica tumoral.

Los resultados obtenidos en esta Tesis, respecto a la utilidad pronóstica del estatus telomérico en el CNMP, se han deducido a partir de una población que incluye a más de 100 individuos; y permiten determinar por primera vez que los tumores que exhiben una longitud telomérica media inferior a la definida a partir de las muestras sanas, o casi cualquier grado de acortamiento telomérico, pueden ser responsables de la evolución adversa de la enfermedad. Estos hallazgos reflejan el complejo papel de los telómeros en la carcinogénesis. Los telómeros acortados, como consecuencia de la replicación celular, representan un verdadero supresor tumoral, pues las células con telómeros críticamente cortos quedan supeditadas a la muerte o a la senescencia celular, eventos mediados por las rutas de p53 y Rb (Shay *et al.*, 1991). En la carcinogénesis bronquial, el acortamiento telomérico es un evento temprano que se detecta en las lesiones preneoplásicas, promueve la inestabilidad cromosómica y favorece las anormalidades citogenéticas. Este evento precede al fracaso de las rutas antes mencionadas, lo cual permite a las células cancerosas evadir la apoptosis o la senescencia celular. La reactivación de la telomerasa se requiere para que el tumor progrese, pues se ocupa de estabilizar la estructura telomérica (revisado por Gazdar y Brambilla, 2010 y Lantuejoul *et al.*, 2005).

En la serie de 68 pacientes afectados de CNMP, objeto del estudio más complejo recogido en esta Tesis, se validan los resultados anteriores. Los individuos cuyos tumores exhiben una longitud telomérica inferior (entre 3.295 y 5.205 Kb) a la definida a partir de las muestras no tumorales (5.44 ± 0.32 Kb), y casi cualquier grado de acortamiento telomérico ($\text{TRF T}/\text{TRF N} < 0.98$), presentan un pronóstico clínico desfavorable. Su probabilidad de recurrir en el proceso tumoral fue 4.65 veces superior a la de los enfermos con una longitud telomérica media tumoral que excede a la definida en las muestras control. Sin embargo, esta serie de pacientes resulta particularmente atractiva, pues permite advertir la existencia de un subgrupo de casos con telómeros críticamente acortados y un pronóstico clínico favorable. La interpretación de este resultado resulta compleja, y además se opone a los datos aportados hasta la fecha acerca del cáncer no microcítico de pulmón y la biología de los telómeros críticamente cortos, en relación al pronóstico de los pacientes (Jeon *et al.*, 2012). Es necesario, por tanto, validar estos hallazgos en una serie más amplia de sujetos. No obstante, no debe ser obviado que, aunque esta población objeto de estudio está perfectamente definida de acuerdo a las variables clínico-patológicas más influyentes, no se han considerado algunas características de los individuos. En relación al hábito tabáquico, la práctica totalidad de los individuos considerados en esta Tesis son fumadores, como consta en la información suministrada por el Servicio de Cirugía. El efecto carcinogénico del tabaco es reconocido desde hace décadas (IARC, 2004), además se conoce también un patrón específico de mutaciones en genes claves del proceso tumoral como *TP53* y *KRAS*, propio de los grandes fumadores (Pfeifer *et al.*, 2002). Tampoco se ha tenido en cuenta el estilo de vida de los individuos o su susceptibilidad genética al cáncer de pulmón (revisado por Brennan *et al.*, 2011). Lo cierto es que, influenciados o no por factores ambientales, los tumores de este subgrupo de pacientes parecen ser sensibles al acortamiento telomérico, quizás porque no hayan adquirido el repertorio de mutaciones necesario para sobrepasar las restricciones que imponen los telómeros críticamente cortos a la progresión tumoral. No debemos olvidarnos de la implicación de la telomerasa; podríamos especular que una reactivación tardía de la enzima, o una dosis insuficiente, no permite rescatar de manera exitosa a las células tumorales de la fase de crisis, que quedan abocadas a la muerte por mitosis catastrófica (revisado por Hornsby, 2007; Portugal *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2006).

La utilidad de la **actividad telomerasa, como marcador de pronóstico clínico** para los pacientes intervenidos quirúrgicamente de un **cáncer no microcítico de pulmón**, también fue objeto de estudio. Los resultados logrados en esta Tesis para el análisis de la actividad telomerasa, que incluye a más de 100 individuos, constatan los previos publicados por nuestro grupo de investigación (Frías *et al.*, 2008): la detección de actividad telomerasa en los tumores es responsable de una evolución clínica ad-

versa. Sin embargo, nuestro estudio no nos permite considerarla como un factor de pronóstico independiente; a menudo el número de casos catalogados en el grupo de actividad telomerasa negativa es bastante limitado y dificulta los análisis estadísticos. En nuestro caso, casi en el 90% de los tumores se detectó actividad telomerasa, y tan sólo el 12% de los casos carecieron de ella.

Son diversas las publicaciones que evalúan la utilidad de determinar la actividad telomerasa en la clínica del cáncer de pulmón. Algunos trabajos incluso consideran provechoso incorporar la determinación de la actividad telomerasa para definir la etiología del aspirado tomado a partir de un infiltrado pulmonar (Targowski *et al.*, 2008). La mayoría de las publicaciones confirman la implicación de la actividad telomerasa en el pronóstico clínico desfavorable de los pacientes (revisado por Gansner y Rosas, 2013). Otros trabajos van más allá, y exploran incluso la relación existente entre el pronóstico adverso y la amplificación del gen de *hTERT* en el cáncer no microcítico de pulmón (Zhu *et al.*, 2006). No obstante, tampoco existe consenso en cuanto a la implicación de la actividad telomerasa en el pronóstico clínico de los pacientes con cáncer no microcítico de pulmón: algunos trabajos descartan la relación entre la actividad telomerasa y la evolución de los pacientes (Hirashima *et al.*, 2000 y Hsu *et al.*, 2004). A pesar de ello, parece obvio pensar que si esta enzima está implicada en la inmortalidad de las células tumorales, los pacientes con tumores que carecen de ella resulten favorecidos, y para el resto representa una prometedora diana terapéutica.

El impacto del **estatus telomérico** sobre el **pronóstico clínico** de los pacientes intervenidos quirúrgicamente de un **carcinoma colorrectal**, también fue considerado en el presente estudio. En este caso, el análisis desarrollado en la serie que incluye a 101 pacientes nos permite identificar dos subgrupos de individuos: los que presentan una longitud telomérica media en la muestra tumoral que excede a 6.35 Kb son susceptibles de experimentar una evolución clínica significativamente más adversa, respecto a aquellos que no exceden de una longitud telomérica media tumoral de 6.35 Kb. Además, ninguno de los pacientes cuyo tumor mostraba un acortamiento telomérico de, al menos, el 30%, respecto al tejido sano, recurrió en el proceso tumoral. De manera opuesta a lo que sucede en los CNMPs, para los carcinomas colorrectales, una longitud telomérica media inferior a la definida a partir de las muestras control, (7.32 Kb), representa un factor protector ante la recidiva en el proceso tumoral tras la resección quirúrgica. Estos resultados validan los publicados por nuestro grupo de investigación a este respecto (García-Aranda *et al.*, 2006). Además están en consonancia con los previos del equipo del Doctor Gertler y cols. (Gertler *et al.*, 2004). De acuerdo a sus resultados, la tasa de supervivencia a 5 años fue significativamente superior en los pacientes con una longitud telomérica tumoral inferior a 5.4 Kb, o un

ratio de acortamiento telomérico de, al menos, el 10%. La publicación reciente de la Doctora Bautista y cols., en relación al valor pronóstico de la longitud telomérica en el cáncer colorrectal, confirma que los tumores con cualquier grado de acortamiento telomérico y que no invaden a los ganglios regionales, otorgan a los pacientes una probabilidad mayor de supervivencia (Valls *et al.*, 2011).

El papel del estatus telomérico en el cáncer colorrectal parece responder a su auténtica funcionalidad: los telómeros cortos desencadenan la puesta en marcha de las rutas de muerte o senescencia celular, y limitan la progresión tumoral (Feldser y Greider, 2007). La excesiva proliferación celular parece superar a los mecanismos de mantenimiento telomérico para compensar las pérdidas debidas a la replicación. No obstante, en algunos casos, la estabilización de los telómeros es inevitable (Hastie *et al.*, 1990 y Bodnar *et al.*, 1998).

En esta misma serie de pacientes hemos evaluado si la presencia o ausencia de **actividad telomerasa** en las muestras de **cáncer colorrectal** constituye un **factor con carácter pronóstico**. Nuestros resultados ofrecen diferencias claras en cuanto a la evolución clínica de ambos grupos, aunque no alcanzaron la significación estadística: ninguno de los diecisiete pacientes, cuyo tumor carecía de actividad telomerasa, recurrió en el proceso tumoral; sin embargo, en doce de los noventa y cinco restantes que formaron parte de este estudio, y en cuyo tumor sí se detectó actividad telomerasa, reapareció la enfermedad.

Los primeros en establecer una relación entre la actividad telomerasa y el pronóstico clínico de los pacientes afectados de cáncer colorrectal fueron el Doctor Tatsumoto y cols. (Tatsumoto *et al.*, 2000). Evaluaron la actividad de la enzima en una serie de 100 tumores colorrectales, y en sus respectivas muestras control. Demostraron que la probabilidad de recidivar en el proceso tumoral era significativamente superior para los pacientes que habían sido sometidos a cirugía curativa y cuyos tumores exhibían una actividad telomerasa elevada. Dos años después de esta publicación, el Doctor Kawanishi-Tabata y cols., analizaron la actividad telomerasa en una serie de 122 tumores primarios de estadio II, procedentes de colon y recto (Kawanishi-Tabata *et al.*, 2002). Sus hallazgos se oponían a los anteriormente mencionados: tras la resección quirúrgica, el pronóstico de los pacientes con tumores negativos para la actividad telomerasa era más adverso que el de los pacientes con tumores telomerasa positivos. En el año 2004, el Doctor Ralf Gertler y su equipo determinaron el papel pronóstico del nivel de expresión de *bTERT* en un grupo de 57 pacientes con carcinoma colorrectal sometidos a cirugía. Sus resultados sitúan al cociente que relaciona el nivel de expresión de *bTERT* en el tumor, respecto al tejido no tumoral, como un factor con valor pronóstico en la supervivencia global (Gertler *et al.*, 2004). Un año después, los hallazgos de la Doctora Sanz-Casla, en una población de 103 pacientes,

constatan que aquellos con actividad telomerasa en su tumor presentan un mayor riesgo de fallecer o recurrir en el proceso tumoral, con independencia de otros factores con valor pronóstico como el estadio y la localización del tumor (Sanz-Casla *et al.*, 2005). Otros trabajos posteriores validan la utilidad de la determinación de la actividad telomerasa para predecir la recurrencia (García-Aranda *et al.*, 2006) o la supervivencia (Vidaurreta *et al.*, 2007) tras la resección quirúrgica de un carcinoma colorrectal. Las últimas publicaciones, a este respecto, consideran los niveles de expresión de *hTERT* determinados por PCR a tiempo real. En el caso del trabajo de la Doctora Safont y cols., en una serie de 48 pacientes, no se otorga a los niveles de expresión de *hTERT* una utilidad para predecir su pronóstico clínico; nótese que se cataloga a los pacientes de acuerdo al ratio de expresión de *hTERT* en el tumor, respecto al tejido sano (Safont *et al.*, 2011). Sin embargo, en la publicación reciente de la Doctora Bertorelle, que contempla a 137 pacientes operados de cáncer colorrectal, los niveles elevados de *hTERT* son responsables de un pronóstico clínico significativamente más adverso, y constituyen un marcador para predecir la evolución de los pacientes independiente a otros, como el estadio y la inestabilidad en las secuencias microsatélite (Bertorelle *et al.*, 2013).

Ciertamente, los resultados hasta la fecha son diversos y no existe un consenso claro en cuanto a los parámetros a considerar: algunos trabajos emplean la actividad de la enzima y otros los niveles de expresión del mensajero de *hTERT*. En algunas publicaciones, el valor pronóstico de la telomerasa se estima considerando la supervivencia global de los pacientes, y en otras se recurre a la supervivencia libre de enfermedad. Los estudios incluyen, en ocasiones, a los pacientes sometidos a cirugía curativa y paliativa, y otros sólo a los intervenidos con fines curativos. Es necesario por tanto, alcanzar un consenso, pues aunque la resección quirúrgica y la quimioterapia adyuvante representan tratamientos curativos eficientes en el cáncer colorrectal, el riesgo de recidiva no siempre puede ser considerado con anticipación. La determinación de la actividad telomerasa, para predecir el pronóstico clínico de los pacientes, puede contribuir a la identificación de grupos de individuos susceptibles de recibir terapias dirigidas a la inhibición de la enzima.

4.4. Expresión diferencial de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral, en los CNMPs y CCRs. Relación con el estatus telomérico.

El acortamiento telomérico es un evento que sucede en las etapas tempranas de la tumorigénesis, y puede limitar la progresión neoplásica si las células tumorales aún cuentan con la funcionalidad de los programas de senescencia y/o muerte celular. El contexto genético determina, por tanto, la respuesta a este evento, y puede contribuir a explicar el pronóstico clínico diferencial que confiere el estatus telomérico, según el tipo tumoral considerado.

Basándonos en este aserto, exploramos el perfil de expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular. Para ello recurrimos a la tecnología de los *arrays*, que nos permitió chequear la expresión de un total de 113 genes relacionados con la transmisión de señales mediadas por p53 (*Oligo GEArray[®] Human p53 Signaling Pathway Microarray*). Como un auténtico guardián del genoma (Lane, 1992), p53 responde ante señales importantes para la iniciación y progresión del cáncer, como las roturas en la doble hebra de ADN, la hipoxia, la activación de oncogenes y los telómeros críticamente acortados. Estos procesos constituyen una verdadera alerta para la estabilización y activación de p53, que promueve la expresión de sus genes diana, mediadores de la apoptosis y la muerte celular. Si p53 fracasa, el ambiente celular es favorable para la supervivencia y proliferación del tumor (Artandi y Attardi, 2005).

La transformación maligna es un proceso complejo, caracterizado por una plétora de alteraciones genéticas y epigenéticas que otorgan a la célula tumoral una serie de ventajas selectivas sobre el resto. Entre ellas se incluyen la autosuficiencia para el crecimiento, la pérdida de sensibilidad a las señales que lo inhiben, la evasión de la muerte celular, la adquisición de un potencial replicativo ilimitado, la angiogénesis, y en último término, la capacidad para la invasión y la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). La membrana de oligonucleótidos *Oligo GEArray[®] Human Cancer Pathway Finder* además de permitirnos examinar el panorama molecular de los tumores en cuanto a estas vías, también completaba el panel de factores relacionados con el control del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia.

La disminución de la longitud telomérica en los tumores, respecto a las muestras control, no tumorales, es un evento común a los dos tipos de cánceres considerados en esta Tesis, y, sin embargo, es responsable de un pronóstico claramente distinto en

cada uno de ellos, como ya lo pusieron de manifiesto los resultados previos de nuestro grupo de investigación (García-Aranda *et al.*, 2006 y Frías *et al.*, 2008) y los propios análisis desarrollados en este estudio. Con el propósito de argumentar molecularmente estos hallazgos, y teniendo en cuenta la propia biología de los telómeros, se desarrolló un análisis comparativo, para cada una de las matrices de oligonucleótidos, cotejando el perfil de expresión de tumores no microcíticos de pulmón y colorrectales, con cualquier grado de acortamiento telomérico, seleccionados de las poblaciones objeto de estudio de esta Tesis.

Este análisis preliminar demuestra, en primer lugar, un patrón de expresión distinto entre los CNMPs y CCRs, con cualquier grado de acortamiento telomérico, para los genes considerados en las matrices de oligonucleótidos; y en segundo lugar, refleja el escenario propio de las células tumorales: están supeditadas a restricciones internas en respuesta a una proliferación incontrolada. Así pues, detectamos la expresión de genes que codifican para proteínas que promocionan la tumorigénesis, como *EGFR* (Lurje y Lenz, 2009), otros con actividad supresora tumoral, como *DAPK1* (Michie *et al.*, 2010) y algunos desempeñan papeles duales, según el contexto y el tipo tumoral considerado, como *GADD45A* (Siafakas y Richardson, 2009), *BNIP3* (Giatromanolaki *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006 y Mellor y Harris, 2007), *AATF* (Passananti *et al.*, 2007), *NDRG1* (Ellen *et al.*, 2008 y Fan *et al.*, 2012) y *SHC1* (Pellegrini *et al.*, 2005). De manera resumida se detallan sus funciones en la siguiente tabla (**Tabla 4.1**).

| PROTEÍNA | FUNCIÓN |
|---|--|
| <p>EGFR</p> <p>(<i>epidermal growth factor receptor</i>)</p> | <p>Perteneciente a la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (ErbB/HER). Está integrada por cuatro glicoproteínas transmembrana, que contienen un dominio extracelular de unión a un ligando y un dominio intracelular tirosina quinasa. Una activación anormal de estos receptores inicia la puesta en marcha de una cascada de señales mitogénicas, entre las que se incluyen la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, <i>mitogen-activated protein kinase</i>), la vía de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)/AKT y la vía de señalización de los <i>transductores</i> de señal y activadores de la transcripción (STAT, <i>signal transducers and activators of transcription</i>).</p> <p>EGFR está sobre-expresado en una amplia variedad de tumores, entre los que se incluyen los tumores no microcíticos de pulmón y colorrectales. Para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico se aprobó el uso de dos anticuerpos monoclonales, <i>Cetuximab</i> y <i>Panitumumab</i>, dirigidos frente al dominio extracelular del EGFR. Los inhibidores del dominio tirosina quinasa de EGFR, <i>Erlotinib</i> y <i>Gefitinib</i>, constituyen herramientas terapéuticas para el tratamiento del CNMP.</p> <p>(Lurje y Lenz, 2009; Muhammad <i>et al.</i>, 2013 y Berger <i>et al.</i>, 2013).</p> |
| <p>DAPK1</p> <p>(<i>Death-associated protein kinase</i>)</p> | <p>La proteína quinasa asociada a muerte, DAPK1 (<i>Death-associated protein kinase</i>) es una serina treonina quinasa regulada por calcio/calmodulina, compuesta por varios dominios funcionales, entre los que se incluyen un dominio quinasa, un dominio de repeticiones de anquirina y un dominio de muerte. Entre sus funciones se encuentran, la regulación de la muerte celular por anoikis⁴⁴ (Yuan y Kroemer, 2010), el control de la apoptosis y la parada del ciclo celular, y la autofagia.</p> <p>La regulación epigenética del promotor de <i>DAPK1</i> está documentada en muchos tipos tumorales, provocando la pérdida de expresión de la proteína. No obstante, también está sujeta a modificaciones post-traduccionales.</p> <p>La inhibición de las acciones pro-apoptóticas de DAPK1, mediada por la quinasa Src, convierten a DAPK en una potencial diana terapéutica ante el tratamiento con los inhibidores de Src, <i>Bosutinib</i> y <i>Dasatinib</i>, ambos aprobados recientemente por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (Bovellan <i>et al.</i>, 2010; Wang <i>et al.</i>, 2002; Chang <i>et al.</i>, 2013; Wu <i>et al.</i>, 2013; Martorati <i>et al.</i>, 2005; Luo <i>et al.</i>, 2011; Inbal <i>et al.</i>, 2002 y http://www.aemps.gob.es/).</p> |
| <p>GADD45A</p> <p>(<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>)</p> | <p>Es una pequeña proteína ácida de 165 aminoácidos, expresada de manera ubicua e implicada en la respuesta al daño en el ADN. Desarrolla acciones fundamentales suprimiendo la proliferación celular, participa en la parada del ciclo, promueve la apoptosis e induce la reparación del ADN; y recientemente se le han atribuido acciones supresoras de la angiogénesis tumoral, así como un papel en la regulación epigenética. También se le asignan funciones promotoras de la supervivencia celular. p53 activado promueve la expresión transcripcional de GADD45A. En relación a su implicación en el cáncer, su efecto biológico depende del contexto celular. No obstante, es considerado en algunos estudios con fines terapéuticos.</p> <p>(Sifakas y Richardson, 2009; Jin <i>et al.</i>, 2000; Tong <i>et al.</i>, 2005; Carrier <i>et al.</i>, 1999; Hildesheim <i>et al.</i>, 2002; Yang <i>et al.</i>, 2013; Barreto <i>et al.</i>, 2007; Kastan <i>et al.</i>, 1992; Zhan <i>et al.</i>, 1994; Cretu <i>et al.</i>, 2009; Tront <i>et al.</i>, 2010 y Jiang <i>et al.</i>, 2007).</p> |

⁴⁴ Forma específica de apoptosis provocada por el *desapego* de las células a la matriz extracelular.

| | |
|--|---|
| <p>BNIP3</p> <p>(<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>)</p> | <p>Es un miembro de la familia de proteínas Bcl-2, que sólo comparte con los otros miembros el dominio BH3. El principal inductor fisiológico de la expresión de <i>BNIP3</i> es la hipoxia. <i>BNIP3</i> está implicado en la muerte celular y en la autofagia. Pero existen otros mecanismos independientes a la hipoxia que promueven la muerte celular mediada por <i>BNIP3</i>. Su implicación en procesos tan complejos como la hipoxia y la autofagia, otorga a <i>BNIP3</i> un papel claramente dependiente del contexto tumoral. No obstante, es también objeto de estudio como posible diana terapéutica en el tratamiento del cáncer. (Mellor y Harris, 2007; Abe <i>et al.</i>, 2005 y Azad y Gibson, 2010).</p> |
| <p>AATF</p> <p>(<i>apoptosis antagonizing transcription factor</i>)</p> | <p>El factor transcripcional antagonista de la apoptosis, AATF, recibe su nombre porque originalmente se describió su función interfiriendo en el proceso de apoptosis inducido por Dlk (<i>DAP like kinase</i>). AATF es un componente de los puntos de control que integran la barrera antitumoral, que protege a las células del daño en el ADN o del estrés oncogénico. También promueve la transcripción génica, funcionando como un adaptador o un mediador entre el aparato transcripcional y los factores de transcripción, pues <i>per se</i> no posee capacidad de unión al ADN. Se le atribuye un comportamiento dualístico según el tipo tumoral considerado. (Page <i>et al.</i>, 1999; Bruno <i>et al.</i>, 2006; Passananti y Fanciulli, 2007; Sharma, 2013 y Di Di Padova <i>et al.</i>, 2003).</p> |
| <p>NDRG1</p> <p>(<i>N-myc downstream regulated 1</i>)</p> | <p>Regulado negativamente por N-Myc, se expresa de manera ubicua en los tejidos y responde a señales de estrés celular. Su regulación es compleja, e implica la interacción con importantes reguladores, como HIF-1α (<i>hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>), p53, N-Myc, C-Myc y AP-1 (<i>activating protein 1</i>), así como a nivel transcripcional, post-transcripcional y traduccional. Está implicado en procesos tan diversos como la diferenciación celular, la activación de p53, el control del huso mitótico, la resistencia a la apoptosis, la metástasis y la hipoxia. Su papel, así como su implicación clínica en el contexto tumoral, es controvertido; no obstante, es también susceptible de ser considerado una posible diana terapéutica. (Ellen <i>et al.</i>, 2008; Kitowska y Pawelczyk, 2010; Akiba <i>et al.</i>, 2011; Bandyopadhyay <i>et al.</i>, 2003; Maruyama <i>et al.</i>, 2006; Azuma <i>et al.</i>, 2012; Cheng <i>et al.</i>, 2011 y Bae <i>et al.</i>, 2013).</p> |
| <p>SHC1</p> <p>(<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>)</p> | <p>Pertenece a una familia de proteínas que incluye a tres miembros, designados como ShcA (o Shc1), ShcB y ShcC. ShcA, con presencia ubicua, es el miembro mejor caracterizado, con tres isoformas, de 66, 52 y 46 kDa, al que originalmente se le atribuyó una función en relación a la cascada Ras/Map quinasa, como una proteína acoplada al receptor activado de EGF. Sin embargo, la isoforma de mayor tamaño tiene unas propiedades únicas, pues es capaz de inhibir la activación de esta vía. Además, los estudios desarrollados en un modelo murino demostraron sus propiedades antiapoptóticas en respuesta al estrés oxidativo, dependiente de p53. En células humanas también se han demostrado sus propiedades pro-apoptóticas, independientes de la forma funcional de p53. Recientemente se le atribuyen propiedades supresoras tumorales, como regulador negativo de la activación de Erk, en células humanas. (Pellegrini <i>et al.</i>, 2005; Tiberi <i>et al.</i>, 2006 y Suen <i>et al.</i>, 2013).</p> |

Tabla 4.1. Resumen de las funciones de las proteínas EGFR, DAPK1, GADD45A, BNIP3, AATF, NDRG1 y SHC1.

Tras este análisis preliminar mediante el empleo de matrices de oligonucleótidos, se procedió a la validación de los resultados recurriendo a la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real. Incluimos en el análisis a todos los casos de las poblaciones iniciales objeto de estudio, con cualquier grado de acortamiento telomérico, de los que se disponía de la información relativa al estatus telomérico, así como del extracto de ARN en las condiciones óptimas para el desarrollo de la técnica. Además de tratar de corroborar los resultados para la expresión diferencial de los siete genes antes mencionados, incluimos a *TP53* y a *CDKN2A*. p53 es responsable de orquestar la puesta en marcha de las vías de senescencia y muerte celular en respuesta al acortamiento telomérico (Feldser y Greider, 2007), limitando así la progresión tumoral. CDKN2A, o p16, parece contribuir también a la inducción de la senescencia en respuesta a la disfunción telomérica (Jacobsy de Lange, 2004 y Wang *et al.*, 2013).

De acuerdo a la técnica de la PCR cuantitativa a tiempo real, el valor medio de expresión de cada gen, Ct, normalizado respecto a la expresión del gen de referencia (Ct de *GAPDH*), para los CNMPs y CCRs, con cualquier grado de acortamiento telomérico, nos permitió validar la expresión superior de *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *EFGR*, *CDKN2A* y *SHC1* en los tumores de pulmón. Sin embargo, la expresión de *TP53* fue superior en los tumores de colon con los telómeros acortados.

No obstante, fueron particularmente atractivos los resultados que nos proporcionó el ensayo de qRT-PCR, cuando los valores de expresión de cada gen en la muestra tumoral se compararon con los obtenidos en la muestra calibradora, integrada por muestras control, no tumorales⁴⁵, ambos valores normalizados respecto a la expresión de *GAPDH*. En este caso, los valores relativos de expresión de *AATF*, *DAPK1*, *GADD45A*, *SHC1* y *TP53* fueron significativamente superiores en los tumores colorectales, con cualquier grado de acortamiento telomérico.

Este pequeño panel de genes podría ayudarnos a comprender el pronóstico favorable que otorga el acortamiento telomérico en los cánceres colorrectales. p53 es un factor de transcripción que se une específicamente a secuencias concretas del genoma, en forma tetramérica. Compuesto por 393 aminoácidos, p53 está integrado por cinco dominios funcionales, entre los que se incluyen: dos dominios de transactivación N-terminal, seguidos por un dominio rico en prolina, un dominio central de unión al ADN, un dominio de tetramerización C-terminal y un domino básico (revisado por Essmann y Schulze-Osthoff, 2012). Junto con p63 y p73, conforman la familia de p53 (Belyi *et al.*, 2010). Aunque la mayoría de los estudios se focalizan en la forma canónica de p53, un total de, al menos, diez isoformas han sido ya descritas

⁴⁵ El ensayo con matrices de oligonucleótidos resultó fallido para la obtención de resultados en relación a las muestras control, no tumorales.

(Bourdon *et al.*, 2005 y Schwerk y Schulze-Osthoff, 2005). Cuando las células no están sometidas a un factor de estrés, mantienen bajos los niveles de p53, gracias a la degradación constante por el sistema proteasoma. La proteína MDM2, que posee actividad intrínseca E3 ligasa, es la responsable de la ubiquitinación, para la posterior degradación proteasómica de p53. La homóloga de MDM2, la proteína MDMX, es requerida para una regulación eficiente de p53. La abundancia, la localización subcelular y las funciones ejercidas por p53 son reguladas mediante modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, la acetilación, la ubiquitilación, o la unión de moléculas semejantes a la ubiquitina, como SUMO o Nedd8, principalmente al dominio N o C terminal de p53 (revisado por Essmann y Schulze-Osthoff, 2012).

La activación de p53, en respuesta a una situación de estrés, tiene consecuencias anti-proliferativas; por ello representa un objetivo claro, susceptible de ser inactivado, en el contexto tumoral. Así pues, las mutaciones somáticas de *TP53* suceden en casi todos los tipos tumorales. Oscilan entre el 38 y el 50% en el caso de los tumores de ovario, esófago, colorrectales, cabeza y cuello, laringe y pulmón; y alrededor del 5%, en el caso de las leucemias primarias, sarcomas, cáncer de testículos, melanomas y cáncer de cérvix (Olivier *et al.*, 2010). La base de datos IARC TP53 recopila la prevalencia de las mutaciones de *TP53* en el cáncer humano (<http://www-p53.iarc.fr/>). En los tumores humanos, son frecuentes las mutaciones de sentido erróneo o alterado (*missense mutations*) de *TP53*, en las que un solo nucleótido es sustituido por otro. De esta forma, se origina una proteína completa, pero con un aminoácido reemplazado. La mayoría de las mutaciones implican la pérdida de la capacidad de p53 para unirse a secuencias específicas del ADN y activar la transcripción de sus genes diana. Además de este mecanismo, existen otros que conducen también a la alteración de p53; por ejemplo, en una situación de heterozigosis, en la que coexisten la forma nativa y mutada de p53, esta última es capaz de antagonizar las funciones de la primera. Algunas isoformas mutantes de p53 pueden adquirir propiedades oncogénicas (*gain-of-function mechanism, GOF*), (revisado por Rivlin *et al.*, 2011). Sin embargo, el escenario en el que situamos nuestros resultados, i.e. tumores colorrectales con acortamiento telomérico, nos sugiere que algunas células tumorales podrían conservar la funcionalidad de p53, pues sus niveles elevados se acompañan también de una expresión superior de algunos de sus genes diana, como *DAPK1*, *GADD45A* y *SHC1*. *DAPK1* y *GADD45A* contienen secuencias de unión para p53, y *SHC1*, participa en la respuesta apoptótica mediada por p53 ante el estrés oxidativo (Martoriati *et al.*, 2005; Kastan *et al.*, 1992 y Pellegrini *et al.*, 2005). Como se describió anteriormente, desempeñan múltiples funciones, pero entre ellas se encuentran la muerte celular y/o la interrupción del ciclo, limitando, por tanto, la progresión del tumor. AATF, cuyos niveles también se encontraron aumentados en los tumores colorrectales con acortamiento telomérico,

demostró ser capaz de inhibir la proliferación de células tumorales de colon, mediante la activación de p21, de forma independiente a p53, como se muestra en el trabajo de la Doctora Di Padova y cols. (Di Di Padova *et al.*, 2003). Por tanto, estos hallazgos parecen reflejar un escenario, según el cual p53 podrían responder al acortamiento telomérico y mediar la puesta en marcha de las vías de muerte y/o senescencia celular, imponiendo límites a la proliferación de los tumores colorrectales. La mayoría de los agentes quimioterapéuticos desarrollan sus acciones a través de la activación de las vías pro-apoptóticas, por lo tanto, estos resultados podrían contribuir a la identificación de grupos de pacientes susceptibles de responder de forma exitosa al tratamiento.

4.5. Expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral en los CNMPs. Relación con la función telomérica y con las variables clínico-patológicas.

El estudio de pronóstico inicial desarrollado en la población de CNMPs original, objeto de estudio de esta Tesis, otorgó a los pacientes con los telómeros más cortos en su tumor la evolución clínica más favorable. La expresión de los nueve genes evaluados resultó ser similar entre las dos subpoblaciones consideradas (3.4.1. La expresión génica y el estatus telomérico). Como ya se mencionó anteriormente, la justificación de estos resultados es difícil, pero no debe ser desestimada. Ciertamente, la biología de los telómeros cortos en el cáncer es compleja (Martinez-Delgado *et al.*, 2013), pero mejorar en el conocimiento de su implicación en los tumores puede contribuir al desarrollo de tratamientos más específicos.

Cuando excluimos del estudio de pronóstico a los pacientes antes mencionados, con los telómeros más cortos, identificamos dos nuevas subpoblaciones, y en este caso son los individuos con una longitud telomérica media inferior en su tumor, los que experimentan un pronóstico más adverso. En relación al análisis de expresión génica resultaron particularmente interesantes los hallazgos para *DAPK1*: con un valor relativo de expresión significativamente disminuido en los pacientes con peor pronóstico, respecto a los pacientes con telómeros más largos y mejor pronóstico clínico, cuyos tumores muestran una mayor actividad transcripcional de este gen, que parece acompañarse también de niveles más elevados de la proteína.

DAPK1 es un claro candidato a ser caracterizado como un supresor tumoral. Como ya se mencionó anteriormente, es una proteína quinasa pro-apoptótica, con un dominio de muerte, que participa en múltiples vías de señalización pro-apoptóticas. Los estudios desarrollados en células tumorales humanas, demuestran que DAPK1 interviene en la actividad pro-apoptótica del TNF- α (*tumor necrosis factor*) y del INF- γ (*interferon, gamma*), participando en la vía de señalización del NF- κ B (Yoo *et al.*, 2012). También modula la parada del ciclo celular en G1, inducida por el *grifolin*⁴⁶ (Ye *et al.*, 2005), como lo ha puesto de manifiesto recientemente el trabajo desarrollado por el Doctor Xiang-jian Luo y cols., en células humanas de carcinoma nasofaríngeo (Luo *et al.*, 2011). DAPK1 demostró ser un modulador de la inducción de la apoptosis y la

⁴⁶ *Grifolin* es un metabolito secundario aislado a partir de los cuerpos fructíferos de *Albatrellus confluens*, con efectos antitumorales.

parada del ciclo celular en G2/M en respuesta a la curcumina⁴⁷ (Ravindran *et al.*, 2009), en la línea celular humana de glioma U251 (Wu *et al.*, 2013).

La metilación del promotor de *DAPK1* ha sido documentada en múltiples tipos de cánceres, y puede contribuir a aumentar la resistencia de las células a la muerte programada (Banzai *et al.*, 2013 y Ovchinnikov *et al.*, 2012). En el cáncer no microcítico de pulmón también se ha evaluado la regulación epigenética de *DAPK1*, aunque los estudios deben ser cuidadosamente considerados, según la población analizada. Los estudios desarrollados en poblaciones americanas muestran la metilación frecuente del promotor de *DAPK1* en CNMP, evidenciando incluso su valor pronóstico (Tang *et al.*, 2000); sin embargo, el trabajo reciente del Doctor Qiang Lin y cols. refleja la ausencia de metilación del promotor en la población china considerada (Lin *et al.*, 2009). La hipermetilación del promotor de *DAPK1* provoca su pérdida de expresión, y así parece suceder en la subpoblación evaluada de tumores no microcíticos de pulmón con acortamiento telomérico (3.4.1. La expresión génica y el estatus telomérico). Los niveles disminuidos de *DAPK1* se acompañan también de una expresión reducida de *GADD45A*, *SHC1* y *TP53*. Podríamos sospechar, por tanto, el fracaso de las vías que limitan la progresión tumoral en respuesta al acortamiento telomérico en los CNMPs; esto podría contribuir a explicar el pronóstico clínico adverso que otorgan los telómeros cortos en los tumores de pulmón. *DAPK1* parece estar también relacionado con las variables clínico-patológicas que definen a los tumores, en particular, nuestro estudio muestra una asociación con el estadio tumoral y el descriptor T. Así, considerando globalmente la población de CNMPs original, objeto de estudio de esta Tesis, los niveles relativos de expresión de *DAPK1* fueron superiores en los tumores de estadio I y en los catalogados como T1. El estudio desarrollado en una población de tumores esofágicos, por los Drs. Wan y Wu, demuestra una correlación entre la expresión de *DAPK1* y las variables clínico-patológicas, tales como el grado de invasión del tumor, el estadio y la diferenciación. En particular, los niveles más elevados de ARNm se detectaron en los tumores que no invadían a los ganglios linfáticos regionales, bien diferenciados y de estadios tempranos (Wan y Wu, 2012). Las acciones anti-metastásicas de *DAPK1* en el cáncer de pulmón también han sido demostradas (Zhang *et al.*, 2004): la sobre-expresión de *DAPK1* es capaz de suprimir el fenotipo maligno de la línea celular de cáncer de pulmón, altamente metastásica, PGCL3, inhibiendo su crecimiento, y su capacidad de invasión y migración, mediante un mecanismo que involucra a p53 y disminuye la expresión de bcl-2. Contemplando las acciones anteriormente descritas, *DAPK1* parece representar una atractiva diana para ser considerada en la terapia del cáncer.

⁴⁷ La curcumina es un componente activo de *Curcuma longa*, ampliamente utilizado como especia en la cocina asiática. Ha demostrado poseer propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y supresoras tumorales.

Para la población de CNMPs, nuestros resultados también reflejan un valor relativo de expresión de *TP53* significativamente superior en los tumores de estadio I y en los catalogados como N0. Aunque ciertamente desconocemos el estatus mutacional de *TP53* en nuestra población de CNMPs, los niveles de ARNm de *TP53* no parecen guardar relación con la presencia de mutaciones en el gen (Végran *et al.*, 2013). Estos datos parecen reflejar el papel de p53 como supresor de la invasión tumoral y la metástasis en el cáncer (Wang *et al.*, 2009). Además, los niveles elevados de *TP53* en los tumores de estadio I se acompañan también de mayores niveles de *GADD45A*. También hallamos una relación significativa entre la recurrencia en el proceso tumoral y el valor relativo de expresión de *EGFR*. En consonancia con trabajos previos, la sobre-expresión de *EGFR* en los tumores no microcíticos de pulmón se asocia con una evolución clínica adversa (Selvaggi *et al.*, 2004), tras la resección quirúrgica. Por último debemos mencionar la expresión significativamente elevada de *AATF*, *DAPK1*, *GADD45A*, *SHC1* y *TP53* en los carcinomas indiferenciados de célula grande, respecto al resto de tipos histológicos. Este resultado debe ser cuidadosamente considerado, pues el número de casos incluidos en este tipo histológico es ciertamente escaso. Se trata además de tumores de estadio I, que no invaden a los ganglios linfáticos regionales y tan solo uno de los casos recurrió en el proceso tumoral. Se requiere, quizás, de una población más elevada y heterogénea, en cuanto a las variables clínico-patológicas, para corroborar estos hallazgos.

Finalmente, en cuanto al estudio que evalúa la posible asociación existente entre la expresión de los nueve genes considerados y la presencia, o ausencia, de la actividad telomerasa, debemos destacar que, aunque no se hallaron diferencias estadísticamente significativas, el valor relativo de expresión de *DAPK1* en los tumores telomerasa negativos duplicó al detectado en los CNMPs con actividad telomerasa. A este respecto resulta particularmente interesante considerar la regulación epigenética de *DAPK1* y *bTERT*. El trabajo reciente publicado por el Doctor Dimitrios Iliopoulos, en una serie de 115 muestras de cérvix, que incluía tejido sano, lesiones premalignas y tumorales, demuestra un aumento en la metilación de *DAPK1* y *bTERT* conforme incrementa el estadio tumoral (Iliopoulos *et al.*, 2009). Así como en el caso de *DAPK1* la metilación de su promotor constituye una estrategia de silenciamiento génico, en el caso de *bTERT*, y para algunos tipos tumorales, la hipermetilación de su promotor se asocia con una expresión incrementada, mientras que la desmetilación inhibe la transcripción del gen (revisado por Daniel *et al.*, 2012). La regulación epigenética opuesta de ambos genes podría justificar los resultados hallados en nuestro estudio.

4.6. Expresión de factores relacionados con las vías de senescencia y muerte celular, y transformación y génesis tumoral en los CCRs. Relación con la función telomérica y con las variables clínico-patológicas.

Son limitados los hallazgos en este apartado, pues el estatus telomérico no nos permitió discriminar entre dos subpoblaciones con distinto pronóstico clínico y, por tanto, no se particularizaron los análisis de expresión génica considerando esta variable. La homogeneidad de la población en cuanto a las variables clínico-patológicas también resultó limitante para el desarrollo de los análisis estadísticos. Tan sólo detectamos una asociación significativa entre el valor relativo de expresión de *AATF* y la actividad telomerasa.

5. Conclusiones

1. En los tumores no microcíticos de pulmón y en los tumores colorrectales analizados, se detecta una longitud telomérica significativamente inferior a la de los tejidos control. Además, existe una correlación entre la longitud de las secuencias teloméricas de los tejidos tumorales y no tumorales.
2. En el CNMP, los resultados obtenidos permiten establecer que cualquier grado de acortamiento telomérico en el tumor, respecto al tejido control, constituye una variable de pronóstico adverso, independiente del estadio tumoral.
3. La actividad telomerasa resulta un indicador de pronóstico adverso en la serie de CNMP investigada.
4. En el CCR, el acortamiento telomérico crítico constituye un factor de pronóstico favorable, independiente del estadio tumoral.
5. En los tumores no microcíticos de pulmón, con acortamiento telomérico, los niveles relativos de expresión de *AATF*, *DAPK1*, *GADD45A*, *SHC1* y *TP53*, factores relacionados con la senescencia, la parada del ciclo celular y la muerte, están disminuidos de manera significativa, respecto a los CCRs, con acortamiento de las secuencias teloméricas.
6. En CNMP, la expresión de *TP53* se relaciona de manera significativa con factores de pronóstico favorable, como son el estadio TNM I y la ausencia de invasión a los ganglios linfáticos.
7. El nivel relativo de expresión de *DAPK1* se asocia de manera inversa con el tamaño de los tumores no microcíticos de pulmón: son los de menor tamaño los que muestran niveles de expresión más elevados.

8. En CNMP se detecta una asociación estadísticamente significativa entre el nivel relativo de expresión de *EGFR* y la recurrencia en el proceso tumoral.

CONCLUSIÓN FINAL

El estatus telomérico representa un parámetro con valor pronóstico en los cánceres no microcíticos de pulmón y colorrectales. La expresión diferencial de factores relacionados con la senescencia y la muerte celular puede sustentar molecularmente el diferente pronóstico clínico que otorga el acortamiento telomérico, en ambos tipos tumorales.

6. Bibliografía

- Abe, T., Toyota, M., Suzuki, H., Murai, M., Akino, K., Ueno, M., Nojima, M., Yawata, A., Miyakawa, H., Suga, T., *et al.* (2005). Upregulation of BNIP3 by 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia-mediated cell death. *Journal Of Gastroenterology* 40, 504-10.
- Abreu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R.M., Lingner, J., y Terns, M.P. (2010). TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2971-82.
- Akiba, J., Murakami, Y., Noda, M., Wata-ri, K., Ogasawara, S., Yoshida, T., Kawahara, A., Sanada, S., Yasumoto, M., Yamaguchi, R., *et al.* (2011). N-myc downstream regulated gene1/Cap43 overexpression suppresses tumor growth by hepatic cancer cells through cell cycle arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Lett.* 310, 25-34.
- Andreu, M. (2011). Capítulo 30. Pólipos colorrectales y poliposis intestinal. Tratamiento de las enfermedades gastroenterológicas. *Www.Studentconsult.Es*.
- Andrew, T., Aviv, A., Falchi, M., Surdulescu, G.L., Gardner, J.P., Lu, X., Kimura, M., Kato, B.S., Valdes, A.M., y Spector, T.D. (2006). Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 480-6.
- Aragona, M., Maisano, R., Panetta, S., Giudice, A., Morelli, M., Torre, I.L., y Torre, F.L. (2000). Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 17, 981-9.
- Armanios, M. (2012). Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat. Res.* 730, 52-8.
- Arora, R., Brun, C.M., y Azzalin, C.M. (2011). TERRA: Long Noncoding RNA at Eukaryotic Telomeres. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 51, 65-94.
- Artandi, S.E., y DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9-18.
- Artandi, S.E., y Attardi, L.D. (2005). Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 881-90.
- Atanasiu, C., Deng, Z., Wiedmer, A., Norseen, J., y Lieberman, P.M. (2006). ORC binding to TRF2 stimulates OriP replication. *EMBO Rep.* 7, 716-21.
- Aubert, G., Lansdorp, P.M., Aubert, G., y Lansdorp, P.M. (2008). Telomeres and Aging. *Physiol. Rev.* 88, 557-579.
- Azad, M.B., y Gibson, S.B. (2010). Role of BNIP3 in proliferation and hypoxia-induced autophagy: implications for personalized cancer therapies. *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 1210, 8-16.
- Azuma, K., Kawahara, A., Hattori, S., Taira, T., Tsurutani, J., Watari, K., Shibata, T., Murakami, Y., Takamori, S., Ono, M., *et al.* (2012). NDRG1/Cap43/Drg-1 may predict tumor angiogenesis and poor outcome in patients with lung cancer. *J Thorac Oncol* 7, 779-89.
- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoraiuli, L., Giulotto, E., y Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian

- chromosome ends. *Science* **318**, 798-801.
- B**ae, D., Jansson, P.J., Huang, M.L., Kovacevic, Z., Kalinowski, D., Lee, C.S., Sahni, S., and Richardson, R. (2013). The role of NDRG1 in the pathology and potential treatment of human cancers. *Journal Of Clinical Pathology* **66**, 911-7.
- Bah, A., Wischniewski, H., Shchepachev, V., y Azzalin, C.M. (2012). The telomeric transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 2995-3005.
- Bandyopadhyay, S., Pai, S.K., Gross, S.C., Hirota, S., Hosobe, S., Miura, K., Saito, K., Commes, T., Hayashi, S., Watabe, M., *et al.* (2003). The Drg-1 gene suppresses tumor metastasis in prostate cancer. *Cancer Res.* **63**, 1731-6.
- Banzai, C., Nishino, K., Quan, J., Yoshihara, K., Sekine, M., Yahata, T., and Tanaka, K. (2013). Promoter methylation of DAPK1, FHIT, MGMT, and CDKN2A genes in cervical carcinoma. *International Journal Of Clinical Oncology*. [Epub ahead of print]
- Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Döderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., *et al.* (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* **445**, 671-5.
- Barsky, S.H., Cameron, R., Osann, K.E., Tomita, D., y Holmes, E.C. (1994). Rising incidence of bronchioloalveolar lung carcinoma and its unique clinicopathologic features. *Cancer* **73**, 1163-70.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633-7.
- Baumann, P., y Price, C. (2010). Pot1 and telomere maintenance. *FEBS Lett.* **584**, 3779-84.
- Belyi, V.A., Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., y Levine, A.J. (2010). The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology* **2**, a001198.
- Berger, L.A., Riesenberger, H., Bokemeyer, C., y Atanackovic, D. (2013). CNS metastases in non-small-cell lung cancer: current role of EGFR-TKI therapy and future perspectives. *Lung Cancer* **80**, 242-8.
- Berman, B.P., Weisenberger, D.J., Aman, J.F., Hinoue, T., Ramjan, Z., Liu, Y., Noushmehr, H., Lange, C.P., van Dijk, C.M., Tollenaar, R.A., *et al.* (2012). Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains. *Nat. Genet.* **44**, 40-6.
- Bertorelle, R., Briarava, M., Rampazzo, E., Biasini, L., Agostini, M., Maretto, I., Lonardi, S., Friso, M.L., Mescoli, C., Zagonel, V., *et al.* (2013). Telomerase is an independent prognostic marker of overall survival in patients with colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **108**, 278-84.
- Bi, X., Wei, S.D., y Rong, Y.S. (2004). Telomere protection without a telomerase; the role of ATM and Mre11 in *Drosophila* telomere maintenance. *Curr. Biol.* **14**, 1348-53.

- Bianchi, A., y Shore, D. (2008). How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol. Cell* 31, 153-65.
- Bisoffi, M., Heaphy, C.M., y Griffith, J.K. (2006). Telomeres: prognostic markers for solid tumors. *Int. J. Cancer* 119, 2255-60.
- Blackburn, E.H. (1994). Telomeres: no end in sight. *Cell* 77, 621-3.
- Blagosklonny, M.V. (2011). Cell cycle arrest is not senescence. *Aging (Albany NY)* 3, 1-8.
- Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics* 6, 611-622.
- Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat. Rev. Genet.* 8, 299-309.
- Blin, N., y Stafford, D.W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3, 2303-8.
- Blot, W.J., y Fraumeni, J.F. (1975). Arsenical air pollution and lung cancer. *Lancet* 2, 142-4.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., y Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-52.
- Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., *et al.* (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 5248-57.
- Bollmann, F.M. (2008). The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. *Bioessays* 30, 728-732.
- Bosetti, C., Malvezzi, M., Rosso, T., Bertuccio, P., Gallus, S., Chatenoud, L., Levi, F., Negri, E., y Vecchia, C.L. (2012). Lung cancer mortality in European women: Trends and predictions. *Lung Cancer* 78, 171-8.
- Boticario, C., y Cascales, M. (2009). *Innovaciones en Cáncer* (Editorial UNED).
- Boulton, S.J., y Jackson, S.P. (1998). Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.* 17, 1819-28.
- Bourdon, J., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., y Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 19, 2122-37.
- Bovellan, M., Fritzsche, M., Stevens, C., y Charras, G. (2010). Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: blebbing in programmed cell death. *FEBS J.* 277, 58-65.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54.
- Brennan, P., Hainaut, P., y Boffetta, P. (2011). Genetics of lung-cancer susceptibility. *The Lancet Oncology* 12, 399-408.

- Brown, L.M., Pottern, L.M., y Blot, W.J. (1984). Lung cancer in relation to environmental pollutants emitted from industrial sources. *Environmental Research* 34, 250-61.
- Brown, T. (2008). *Genomas/ Genome* (Ed. Médica Panamericana).
- Bruno, T., de Nicola, F., Iezzi, S., Lecis, D., D'Angelo, C., Di Padova, M., Corbi, N., Dimiziani, L., Zannini, L., Jekimovs, C., *et al.* (2006). Chk-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. *Cancer Cell* 10, 473-86.
- Bryce, L.A., Morrison, N., Hoare, S.F., Muir, S., y Keith, W.N. (2000). Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2, 197-201.
- Buckingham, L., Faber, L.P., Kim, A., Liptay, M., Barger, C., Basu, S., Fidler, M., Walters, K., Bonomi, P., y Coon, J. (2010). PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 126, 1630-9.
- Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B.V., Györfy, B., Schmitt, W.D., Darb-Esfahani, S., y Denkert, C. (2012). Cut-off Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *Plos ONE* 7, e51862.
- Cagle, P.T., Allen, T.C., Dacic, S., Beasley, M.B., Borczuk, A.C., Chirieac, L.R., Laucirica, R., Ro, J.Y., y Kerr, K.M. (2011). Revolution in lung cancer: new challenges for the surgical pathologist. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 135, 110-6.
- Callén, E., y Surrallés, J. (2004). Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *Mutat. Res.* 567, 85-104.
- Carrier, F., Georgel, P.T., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, H.U., Antinore, M.J., Gariboldi, M., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Pommier, Y., *et al.* (1999). Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1673-85.
- Chai, W., Sfeir, A.J., Hoshiyama, H., Shay, J.W., y Wright, W.E. (2006). The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep.* 7, 225-30.
- Chang, C., Yang, M., Lin, B., Chen, S., Pan, S., Hsiao, M., Lai, T., Lin, S., Jeng, Y., Chu, C., *et al.* (2013). CCN2 inhibits lung cancer metastasis through promoting DAPK-dependent anoikis and inducing EGFR degradation. *Cell Death Differ.* 20, 443-55.
- Chen, Y., Yang, Y., van Overbeek, M., Donigian, J.R., Baciú, P., de Lange, T., y Lei, M. (2008). A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. *Science* 319, 1092-6.
- Cheng, J., Xie, H., Xu, X., Wu, J., Wei, X., Su, R., Zhang, W., Lv, Z., Zheng, S., y Zhou, L. (2011). NDRG1 as a biomarker for metastasis, recurrence and of poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 310, 35-45.
- Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-9.

- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., y de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science* 270, 1663-7.
- Ciapponi, L., Cenci, G., Ducau, J., Flores, C., Johnson-Schlitz, D., Gorski, M.M., Engels, W.R., y Gatti, M. (2004). The *Drosophila* Mre11/Rad50 complex is required to prevent both telomeric fusion and chromosome breakage. *Curr. Biol.* 14, 1360-6.
- Codd, V., Mangino, M., van der Harst, P., Braund, P.S., Kaiser, M., Beveridge, A.J., Rafelt, S., Moore, J., Nelson, C., Soranzo, N., *et al.* (2010). Common variants near TERC are associated with mean telomere length. *Nat. Genet.* 42, 197-9.
- Collins, M., Renault, V., Grobler, L.A., Gibson, A.S., Lambert, M.I., Derman, E.W., Butler-Browne, G.S., Noakes, T.D., y Mouly, V. (2003). Athletes with exercise-associated fatigue have abnormally short muscle DNA telomeres. *Med Sci Sports Exerc* 35, 1524-8.
- Cook, B.D., Dynek, J.N., Chang, W., Shostak, G., y Smith, S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 22, 332-42.
- Cretu, A., Sha, X., Tront, J., Hoffman, B., y Liebermann, D.A. (2009). Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer Therapy* 7, 268-276.
- D**aniel, M., Peek, G.W., y Tollefsbol, T.O. (2012). Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene* 498, 135-46.
- Darzacq, X., Kittur, N., Roy, S., Shav-Tal, Y., Singer, R.H., y Meier, U.T. (2006). Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *J. Cell Biol.* 173, 207-18.
- DeLeón, R.S. (2004). Bases de neumonología clínica (CDCH UCV).
- Deng, Y., y Chang, S. (2007). Role of telomeres and telomerase in genomic instability, senescence and cancer. *Lab. Invest.* 87, 1071-6.
- Deng, Y., Chan, S.S., y Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nature Reviews. Cancer* 8, 450-8.
- Denko, N.C., Giaccia, A.J., Stringer, J.R., y Stambrook, P.J. (1994). The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 5124-8.
- Denoix, P. (1946). Enquete permanent dans les centres anticancereux. *Bull. Inst. Nat. Hyg.* 1.
- Deryusheva, S., y Gall, J.G. (2009). Small Cajal body-specific RNAs of *Drosophila* function in the absence of Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell* 20, 5250-9.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-42.
- Di Padova, M., Bruno, T., de Nicola, F., Iezzi, S., D'Angelo, C., Gallo, R., Nicotia, D., Corbi, N., Biroccio, A., Floridi, A., *et al.* (2003). Che-1 arrests human colon carcinoma cell proliferation by displacing HDAC1 from the p21WAF1/CIP1 promoter. *J. Biol. Chem.* 278, 36496-504.

- Dockery, D.W., 3rd, C.A., Xu, X., Spengler, J.D., Ware, J.H., Fay, M.E., Ferris, B.G., y Speizer, F.E. (1993). An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N. Engl. J. Med.* *329*, 1753-9.
- Donaldson, L., Fordyce, C., Gilliland, F., Smith, A., Feddersen, R., Joste, N., Moyzis, R., y Griffith, J. (1999). Association between outcome and telomere DNA content in prostate cancer. *The Journal Of Urology* *162*, 1788-92.
- Donate, L.E., y Blasco, M.A. (2011). Telomeres in cancer and ageing. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London. Series B, Biological Sciences* *366*, 76-84.
- Ellen, T.P., Ke, Q., Zhang, P., y Costa, M. (2008). NDRG1, a growth and cancer related gene: regulation of gene expression and function in normal and disease states. *Carcinogenesis* *29*, 2-8.
- Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J., y Moore, M.A. (1997). Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* *3*, 1931-41.
- Epel, E.S. (2009). Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging? *Hormones (Athens, Greece)* *8*, 7-22.
- Epel, E.S., Blackburn, E.H., Lin, J., Dhabhar, F.S., Adler, N.E., Morrow, J.D., y Cawthon, R.M. (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 17312-5.
- Escudero, M.P. (2004). Incidencia y supervivencia del cáncer de colon y recto en la provincia de Tarragona (1980-1998).
- Escuín, J.S. (2009). [Lung cancer in Spain. Current epidemiology, survival, and treatment]. *Arch. Bronconeumol.* *45*, 341-8.
- Essmann, F., y Schulze-Osthoff, K. (2012). Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy. *British Journal Of Pharmacology* *165*, 328-44.
- Fan, C., Yu, J., Liu, Y., Xu, H., y Wang, E. (2012). Increased NDRG1 Expression is Associated with Advanced T Stages and Poor Vascularization in Non-small Cell Lung Cancer. *Pathology & Oncology Research* *18*, 549-556.
- Farnung, B.O., Brun, C.M., Arora, R., Lorenzi, L.E., y Azzalin, C.M. (2012). Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells. *Plos ONE* *7*, e35714.
- Farnung, B.O., Giulotto, E., y Azzalin, C.M. (2010). Promoting transcription of chromosome ends. *Transcription* *1*, 140-143.
- Fearon, E.R., y Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759-67.
- Feldser, D.M., y Greider, C.W. (2007). Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* *11*, 461-9.
- Feldman, M., Lawrence, Marvin, Scharschmidt, B.F., y Sleisenger, M.H. (2002). Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology/Diagnosis/ Management (2 Volume Set) (Saunders).

- Fernández-Marcelo, T., Morán, A., de Juan, C., Pascua, I., Head, J., Gómez, A., Hernando, F., López-Asenjo, J.A., Hernández, S., Sánchez-Pernaute, A., *et al.* (2012). Differential expression of senescence and cell death factors in non-small cell lung and colorectal tumors showing telomere attrition. *Oncology* 82, 153-64.
- Fitzpatrick (2010). *Dermatología En Medicina General / Dermatology in General Medicine* (Ed. Médica Panamericana).
- Fitzpatrick, A.L., Kronmal, R.A., Kimura, M., Gardner, J.P., Psaty, B.M., Jenny, N.S., Tracy, R.P., Hardikar, S., y Aviv, A. (2011). Leukocyte telomere length and mortality in the Cardiovascular Health Study. *The Journals Of Gerontology. Series A, Biological Sciences And Medical Sciences* 66, 421-9.
- Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., y Blasco, M.A. (2008). The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* 22, 654-67.
- Fordyce, C.A., Heaphy, C.M., Bisoffi, M., Wyaco, J.L., Joste, N.E., Mangalik, A., Baumgartner, K.B., Baumgartner, R.N., Hunt, W.C., y Griffith, J.K. (2006). Telomere content correlates with stage and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Research And Treatment* 99, 193-202.
- Fordyce, C.A., Heaphy, C.M., Joste, N.E., Smith, A.Y., Hunt, W.C., y Griffith, J.K. (2005). Association between cancer-free survival and telomere DNA content in prostate tumors. *The Journal Of Urology* 173, 610-4.
- Franco, S., Blasco, M.A., Siedlak, S.L., Harris, P.L., Moreira, P.I., Perry, G., y Smith, M.A. (2006). Telomeres and telomerase in Alzheimer's disease: epiphenomena or a new focus for therapeutic strategy? *Alzheimer's & Dementia : The Journal Of The Alzheimer's Association* 2, 164-8.
- Frias, C., Pampalona, J., Genesca, A., y Tusell, L. (2012). Telomere dysfunction and genome instability. *Frontiers In Bioscience : A Journal And Virtual Library* 17, 2181-96.
- Frías, C., García-Aranda, C., de Juan, C., Morán, A., Ortega, P., Gómez, A., Hernando, F., López-Asenjo, J., Torres, A., Benito, M., *et al.* (2008). Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 60, 416-25.
- Fu, D., y Collins, K. (2007). Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Mol. Cell* 28, 773-85.
- Gallardo, F., y Chartrand, P. (2008). Telomerase biogenesis: The long road before getting to the end. *RNA Biol* 5, 212-5.
- Gallego, M.E., y White, C.I. (2001). RAD50 function is essential for telomere maintenance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 1711-6.
- Gansner, J.M., y Rosas, I.O. (2013). Telomeres in lung disease. *Translational Research : The Journal Of Laboratory And Clinical Medicine*.
- García-Aranda, C., de Juan, C., Díaz-López, A., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A., Díaz-Rubio, E., Balibrea, J., Benito, M., y Iniesta, P. (2006). Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expres-

- sion in colorectal carcinoma. *Cancer* 106, 541-51.
- Gazdar, A.F. (2010). Should we continue to use the term non-small-cell lung cancer? *Ann. Oncol.* 21 *Suppl* 7, vii225-9.
- Gazdar, A.F., y Brambilla, E. (2010). Pre-neoplasia of lung cancer. *Cancer Biomarkers : Section A Of Disease Markers* 9, 385-96.
- Gertler, R., Rosenberg, R., Stricker, D., Friederichs, J., Hoos, A., Werner, M., Ulm, K., Holzmann, B., Nekarda, H., y Siewert, J. (2004). Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 22, 1807-14.
- Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., Sowter, H.M., Sivridis, E., Gibson, S., Gatter, K.C., y Harris, A.L. (2004). BNIP3 expression is linked with hypoxia-regulated protein expression and with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 5566-71.
- Gomez, D.E., Armando, R.G., Farina, H.G., Menna, P.L., Cerrudo, C.S., Ghiringhelli, P.D., y Alonso, D.F. (2012). Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int. J. Oncol.* 41, 1561-9.
- Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Meyskens, F.L., Omenn, G.S., Valanis, B., y Williams, J.H. (2004). The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1743-50.
- Grady, W.M. (2004). Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Reviews* 23, 11-27.
- Greaves, M. (2002). *Cáncer (Crítica)*.
- Greenberg, R.A., Allsopp, R.C., Chin, L., Morin, G.B., y DePinho, R.A. (1998). Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* 16, 1723-30.
- Greenwood, J., y Cooper, J.P. (2012). Non-coding telomeric and subtelomeric transcripts are differentially regulated by telomeric and heterochromatin assembly factors in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 40, 2956-63.
- Greider, C.W., y Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405-13.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., y de Lange, T. (1999a). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-14.
- Griffith, J.K., Bryant, J.E., Fordyce, C.A., Gilliland, F.D., Joste, N.E., y Moyzis, R.K. (1999b). Reduced telomere DNA content is correlated with genomic instability and metastasis in invasive human breast carcinoma. *Breast Cancer Research And Treatment* 54, 59-64.
- Hagggar, F.A., y Boushey, R.P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics In Colon And Rectal Surgery* 22, 191-7.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., y Bartek, J. (2008). An oncogene-induced

- DNA damage model for cancer development. *Science* 319, 1352-5.
- Hanahan, D., y Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K., y Allshire, R.C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-8.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614-36.
- Hayflick, L., y Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- Heaphy, C.M., Subhawong, A.P., Hong, S., Goggins, M.G., Montgomery, E.A., Gabrielson, E., Netto, G.J., Epstein, J.I., Lotan, T.L., Westra, W.H., *et al.* (2011). Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am. J. Pathol.* 179, 1608-15.
- Heaphy, C.M., Yoon, G.S., Peskoe, S.B., Joshi, C.E., Lee, T.K., Giovannucci, E., Mucci, L.A., Kenfield, S.A., Stampfer, M.J., Hicks, J.L., *et al.* (2013). Prostate Cancer Cell Telomere Length Variability and Stromal Cell Telomere Length as Prognostic Markers for Metastasis and Death. *Cancer Discovery* 3, 1130-41.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., y Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 1-10.
- Heist, R.S., Sequist, L.V., y Engelman, J.A. (2012). Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol* 7, 924-33.
- Hildesheim, J., Bulavin, D.V., Anver, M.R., Alvord, W.G., Hollander, M.C., Vardanian, L., y Fornace, A.J., Jr (2002). Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res.* 62, 7305-15.
- Hinoue, T., Weisenberger, D.J., Lange, C.P., Shen, H., Byun, H., van den Berg, D., Malik, S., Pan, F., Noushmehr, H., van Dijk, C.M., *et al.* (2012). Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* 22, 271-82.
- Hirashima, T., Komiya, T., Nitta, T., Takada, Y., Kobayashi, M., Masuda, N., Matui, K., Takada, M., Kikui, M., Yasumitsu, T., *et al.* (2000). Prognostic significance of telomeric repeat length alterations in pathological stage I-III non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 20, 2181-7.
- Hiyama, K. (2009). Telomeres and Telomerase in Cancer (Springer).
- Hodes, R.J., Hathcock, K.S., y Weng, N. (2002). Telomeres in T and B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 699-706.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-74.
- Hoffmann, J., Erben, Y., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., y Spyridopoulos, I. (2009). Telomere length-heterogeneity among myeloid cells is a predictor for chronological ageing. *Exp. Gerontol.* 44, 363-6.
- Hornsby, P.J. (2007). Telomerase and the aging process. *Exp. Gerontol.* 42, 575-81.
- Hoyeraal, H.M., Lamvik, J., y Moe, P.J. (1970). Congenital hypoplastic thrombocytopenia and cerebral malformations in two brothers. *Acta Paediatrica Scandinavica* 59, 185-91.

- Hreidarsson, S., Kristjánsson, K., Johannesson, G., y Johannsson, J.H. (1988). A syndrome of progressive pancytopenia with microcephaly, cerebellar hypoplasia and growth failure. *Acta Paediatrica Scandinavica* 77, 773-5.
- Hsiao, S.J., y Smith, S. (2008). Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* 90, 83-92.
- Hsu, C.P., Miaw, J., Shai, Sen, E., y Chen, C.Y. (2004). Correlation between telomerase expression and terminal restriction fragment length ratio in non-small cell lung cancer--an adjusted measurement and its clinical significance. *European Journal Of Cardio-Thoracic Surgery : Official Journal Of The European Association For Cardio-Thoracic Surgery* 26, 425-31.
- Hsu, C., Hsu, N., Lee, L., y Ko, J. (2006). Ets2 binding site single nucleotide polymorphism at the hTERT gene promoter--effect on telomerase expression and telomere length maintenance in non-small cell lung cancer. *European Journal Of Cancer (Oxford, England : 1990)* 42, 1466-74.
- Hsu, C., Ko, J., Shai, S., y Lee, L. (2007). Modulation of telomere shelterin by TRF1 [corrected] and TRF2 interacts with telomerase to maintain the telomere length in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 58, 310-6.
- Hu, J., Hwang, S.S., Liesa, M., Gan, B., Sahin, E., Jaskelioff, M., Ding, Z., Ying, H., Boutin, A.T., Zhang, H., *et al.* (2012). Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. *Cell* 148, 651-63.
- Hubbard, R., Venn, A., Lewis, S., y Britton, J. (2000). Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 5-8.
- Hänsel, R., Löhr, F., Foldynová-Trantírková, S., Bamberg, E., Trantírek, L., y Dötsch, V. (2011). The parallel G-quadruplex structure of vertebrate telomeric repeat sequences is not the preferred folding topology under physiological conditions. *Nucleic Acids Res.* 39, 5768-75.
- IARC (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. (Lyon, France: IARC).
- Iliopoulos, D., Oikonomou, P., Messinis, I., y Tsezou, A. (2009). Correlation of promoter hypermethylation in hTERT, DAPK and MGMT genes with cervical oncogenesis progression. *Oncol. Rep.* 22, 199-204.
- Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G., y Kimchi, A. (2002). DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J. Cell Biol.* 157, 455-68.
- Jackson, S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687-96.
- Jacobs, J.J., y de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr. Biol.* 14, 2302-8.
- Jacobs, J.J., y de Lange, T. (2005). p16INK4a as a second effector of the telomere damage pathway. *Cell Cycle* 4, 1364-8.
- Jarrard, D.F., Bussemakers, M.J., Bova, G.S., e Isaacs, W.B. (1995). Regional loss of imprinting of the insulin-like growth

- factor II gene occurs in human prostate tissues. *Clin. Cancer Res.* 1, 1471-8.
- Jeon, H., Choi, Y.Y., Choi, J.E., Lee, W.K., Lee, E., Yoo, S.S., Lee, S.Y., Lee, J., Cha, S.I., Kim, C.H., *et al.* (2012). Telomere length of tumor tissues and survival in patients with early stage non-small cell lung cancer. *Molecular Carcinogenesis*. [Epub ahead of print].
- Jesus, B.B., y Blasco, M.A. (2013). Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends In Genetics : TIG*.
- Jiang, T., Soprano, D.R., y Soprano, K.J. (2007). GADD45A is a mediator of CD437 induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Journal Of Cellular Physiology* 212, 771-9.
- Jin, S., Antinore, M.J., Lung, F.D., Dong, X., Zhao, H., Fan, F., Colchagie, A.B., Blanck, P., Roller, P.P., Fornace, A.J., Jr, *et al.* (2000). The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J. Biol. Chem.* 275, 16602-8.
- Jover, R., y Payá, A. (2003). [Microsatellite instability in colorectal cancer: concept, detection methods and clinical utility]. *Gastroenterol Hepatol* 26, 656-63.
- Jády, B.E., Richard, P., Bertrand, E., y Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol. Biol. Cell* 17, 944-54.
- K**abir, S., Sfeir, A., y de Lange, T. (2010). Taking apart Rap1: an adaptor protein with telomeric and non-telomeric functions. *Cell Cycle* 9, 4061-7.
- Kaira, K., Sunaga, N., Tomizawa, Y., Yanagitani, N., Ishizuka, T., Saito, R., Nakajima, T., y Mori, M. (2007). Epigenetic inactivation of the RAS-effector gene RASSF2 in lung cancers. *Int. J. Oncol.* 31, 169-73.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., y de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-5.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., y Fornace, A.J., Jr (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587-97.
- Kawanishi-Tabata, R., Lopez, F., Frattantonio, S., Kim, N., Goldblum, J., Tubbs, R., Elson, P., Lavery, I., Bukowski, R.M., Ganapathi, R., *et al.* (2002). Telomerase activity in stage II colorectal carcinoma. *Cancer* 95, 1834-9.
- Kim, H., Kwon, Y.M., Kim, J.S., Lee, H., Park, J., Shim, Y.M., Han, J., Park, J., y Kim, D. (2004). Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 2363-70.
- Kim, H., Lee, O., Xin, H., Chen, L., Qin, J., Chae, H.K., Lin, S., Safari, A., Liu, D., y Songyang, Z. (2009). TRF2 functions as a protein hub and regulates telomere maintenance by recognizing specific peptide motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 372-9.
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., y Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-5.

- Kirk, K.E., Harmon, B.P., Reichardt, I.K., Sedat, J.W., y Blackburn, E.H. (1997). Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science* 275, 1478-81.
- Kironmai, K.M., y Muniyappa, K. (1997). Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes To Cells : Devoted To Molecular & Cellular Mechanisms* 2, 443-55.
- Kirwan, M., y Dokal, I. (2008). Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces. *Clinical Genetics* 73, 103-12.
- Kitowska, A., y Pawelczyk, T. (2010). N-myc downstream regulated 1 gene and its place in the cellular machinery. *Acta Biochimica Polonica* 57, 15-21.
- Knight, S.W., Heiss, N.S., Vulliamy, T.J., Aalfs, C.M., McMahon, C., Richmond, P., Jones, A., Hennekam, R.C., Poustka, A., Mason, P.J., *et al.* (1999). Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1. *Br. J. Haematol.* 107, 335-9.
- Ko, E., Kim, Y., Bin Lee, B., Han, J., Song, S.Y., Shim, Y.M., Park, J., y Kim, D. (2009). Relationship of phospho-pRb (Ser-807/811) level to exposure to tobacco smoke in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 274, 225-32.
- Koering, C.E., Pollice, A., Zibella, M.P., Bauwens, S., Puisieux, A., Brunori, M., Brun, C., Martins, L., Sabatier, L., Pulitzer, J.F., *et al.* (2002). Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep.* 3, 1055-61.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., y Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12072-7.
- Kyle, F., y Spicer, J. (2008). Targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Cancer Imaging : The Official Publication Of The International Cancer Imaging Society* 8, 199-205.
- Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T., y Inoue, M. (2008). Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Sci.* 99, 1528-38.
- Lacadena, J.R. (1996). *Citogenética* (Editorial Complutense).
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lan, Q., Cawthon, R., Gao, Y., Hu, W., 3rd, H.D., Barone-Adesi, F., Ji, B., Bassig, B., Chow, W., Shu, X., *et al.* (2013). Longer telomere length in peripheral white blood cells is associated with risk of lung cancer and the rs2736100 (CLPTM1L-TERT) polymorphism in a prospective cohort study among women in China. *Plos ONE* 8, e59230.
- Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-6.
- Lantuejoul, S., Soria, J.C., Moro-Sibilot, D., Morat, L., Veyrenc, S., Lorimier, P., Brichon, P.Y., Sabatier, L., Brambilla, C., y Brambilla, E. (2004). Differential expression of telomerase reverse transcrip-

- tase (hTERT) in lung tumours. *Br. J. Cancer* *90*, 1222-9.
- Lantuejoul, S., Soria, J.C., Morat, L., Lorimier, P., Moro-Sibilot, D., Sabatier, L., Brambilla, C., y Brambilla, E. (2005). Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin. Cancer Res.* *11*, 2074-82.
- Lantu  joul, S., Salon, C., Soria, J., y Brambilla, E. (2007). Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. *Int. J. Cancer* *120*, 1835-41.
- Latrick, C.M., y Cech, T.R. (2010). POT1-TPP1 enhances telomerase processivity by slowing primer dissociation and aiding translocation. *EMBO J.* *29*, 924-33.
- Leem, S., Londoño-Vallejo, J.A., Kim, J., Bui, H., Tubacher, E., Solomon, G., Park, J., Horikawa, I., Kouprina, N., Barrett, J.C., *et al.* (2002). The human telomerase gene: complete genomic sequence and analysis of tandem repeat polymorphisms in intronic regions. *Oncogene* *21*, 769-77.
- Li, B., Oestreich, S., y de Lange, T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* *101*, 471-83.
- Li, Z., Tomlinson, R.L., Terns, R.M., y Terns, M.P. (2010). Telomerase trafficking and assembly in *Xenopus* oocytes. *J. Cell. Sci.* *123*, 2464-72.
- Lin, Q., Geng, J., Ma, K., Yu, J., Sun, J., Shen, Z., Bao, G., Chen, Y., Zhang, H., He, Y., *et al.* (2009). RASSF1A, APC, ESR1, ABCB1 and HOXC9, but not p16INK4A, DAPK1, PTEN and MT1G genes were frequently methylated in the stage I non-small cell lung cancer in China. *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology* *135*, 1675-84.
- Lin, R., Hsieh, Y., Lin, P., Hsu, H., Chen, C., Tang, Y., Lee, C., y Wang, Y. (2010). The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients. *The Journal Of Clinical Investigation* *120*, 521-32.
- Lin, R., Hsu, H., Chang, J., Chen, C., Chen, J., y Wang, Y. (2007). Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* *55*, 205-13.
- Liu, Y., Lan, Q., Siegfried, J.M., Luketich, J.D., y Keohavong, P. (2006). Aberrant promoter methylation of p16 and MGMT genes in lung tumors from smoking and never-smoking lung cancer patients. *Neoplasia* *8*, 46-51.
- Lombard, D.B., y Guarente, L. (2000). Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres. *Cancer Res.* *60*, 2331-4.
- Londoño-Vallejo, J.A., DerSarkissian, H., Cazes, L., y Thomas, G. (2001). Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res.* *29*, 3164-71.
- Londoño-Vallejo, J.A. (2008). Telomere instability and cancer. *Biochimie* *90*, 73-82.
- Lu, L., Zhang, C., Zhu, G., Irwin, M., Risch, H., Menato, G., Mitidieri, M., Katsaros, D., y Yu, H. (2011). Telomerase expression and telomere length in breast cancer and their associations with adjuvant treatment and disease outcome. *Breast Cancer Research : BCR* *13*, R56.
- Lud  rus, M.E., van Steensel, B., Chong, L., Sibon, O.C., Cremers, F.F., y de

- Lange, T. (1996). Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *J. Cell Biol.* 135, 867-81.
- Lue, N.F. (2004). Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? *Bioessays* 26, 955-62.
- Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z., y Lingner, J. (2008). The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 32, 465-77.
- Lundblad, V. (2000). Molecular biology. Telomeres keep on rappin'. *Science* 288, 2141-2.
- Lundblad, V. (2001). Genome instability: McClintock revisited. *Curr. Biol.* 11, R957-60.
- Luo, X., Li, W., Yang, L., Yu, X., Xiao, L., Tang, M., Dong, X., Deng, Q., Bode, A.M., Liu, J., *et al.* (2011). DAPK1 mediates the G1 phase arrest in human nasopharyngeal carcinoma cells induced by grifolin, a potential antitumor natural product. *European Journal Of Pharmacology* 670, 427-34.
- Lurje, G., y Lenz, H. (2009). EGFR signaling and drug discovery. *Oncology* 77, 400-10.
- M**ahmoudi, S., Henriksson, S., Weibrecht, I., Smith, S., Söderberg, O., Strömblad, S., Wiman, K.G., y Farnebo, M. (2010). WRAP53 is essential for Cajal body formation and for targeting the survival of motor neuron complex to Cajal bodies. *Plos Biology* 8, e1000521.
- Maláska, J., Kunická, Z., Borský, M., Sklenicková, M., Novotná, M., Fajkusová, L., Zaloudík, J., y Fajkus, J. (2004). Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma. *Neoplasma* 51, 90-6.
- Mangino, M., Brouillette, S., Braund, P., Tirmizi, N., Vasa-Nicotera, M., Thompson, J.R., y Samani, N.J. (2008). A regulatory SNP of the BICD1 gene contributes to telomere length variation in humans. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2518-23.
- Martens, U.M., Zijlmans, J.M., Poon, S.S., Dragowska, W., Yui, J., Chavez, E.A., Ward, R.K., y Lansdorp, P.M. (1998). Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat. Genet.* 18, 76-80.
- Martens, U.M., Brass, V., Sedlacek, L., Pantic, M., Exner, C., Guo, Y., Engelhardt, M., Lansdorp, P.M., Waller, C.F., y Lange, W. (2002). Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 119, 810-8.
- Martinez, P., Thanasoula, M., Carlos, A.R., Gómez-López, G., Tejera, A.M., Schoeftner, S., Dominguez, O., Pisano, D.G., Tarsounas, M., y Blasco, M.A. (2010). Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nat. Cell Biol.* 12, 768-80.
- Martinez-Delgado, B., Gallardo, M., Tanic, M., Yanowsky, K., Inglada-Perez, L., Barroso, A., Rodriguez-Pinilla, M., Cañamero, M., Blasco, M.A., y Benitez, J. (2013). Short telomeres are frequent in hereditary breast tumors and are associated with high tumor grade. *Breast Cancer Research And Treatment* 141, 231-42.

- Martins, C.P., Brown-Swigart, L., y Evan, G.I. (2006). Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127, 1323-34.
- Martoriati, A., Doumont, G., Alcalay, M., Bellefroid, E., Pelicci, P.G., y Marine, J. (2005). *dapk1*, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53. *Oncogene* 24, 1461-6.
- Martínez, P., y Blasco, M.A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature Reviews Cancer* 11, 161-176.
- Maruyama, Y., Ono, M., Kawahara, A., Yokoyama, T., Basaki, Y., Kage, M., Aoyagi, S., Kinoshita, H., y Kuwano, M. (2006). Tumor growth suppression in pancreatic cancer by a putative metastasis suppressor gene *Cap43/NDRG1/Drg-1* through modulation of angiogenesis. *Cancer Res.* 66, 6233-42.
- Mason, P.J., Wilson, D.B., y Bessler, M. (2005). Dyskeratosis congenita -- a disease of dysfunctional telomere maintenance. *Current Molecular Medicine* 5, 159-70.
- Mayer, S., Brüderlein, S., Perner, S., Wai-bel, I., Holdenried, A., Ciloglu, N., Hasel, C., Mattfeldt, T., Nielsen, K.V., y Möller, P. (2006). Sex-specific telomere length profiles and age-dependent erosion dynamics of individual chromosome arms in humans. *Cytogenet. Genome Res.* 112, 194-201.
- Meeker, A.K., Hicks, J.L., Platz, E.A., March, G.E., Bennett, C.J., Delannoy, M.J., y de Marzo, A.M. (2002). Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 62, 6405-9.
- Mellor, H.R., y Harris, A.L. (2007). The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Reviews* 26, 553-66.
- Meyne, J., Ratliff, R.L., y Moyzis, R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7049-53.
- Mialou, V., Leblanc, T., de Latour, R.P., Dalle, J., y Socié, G. (2013). [Dyskeratosis congenita: An update.]. *Arch Pediatr.*
- Michie, A.M., McCaig, A.M., Nakagawa, R., y Vukovic, M. (2010). Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer. *FEBS J.* 277, 74-80.
- Miura, I., Graziano, S.L., Cheng, J.Q., Doyle, L.A., y Testa, J.R. (1992). Chromosome alterations in human small cell lung cancer: frequent involvement of 5q. *Cancer Res.* 52, 1322-8.
- Mollberg, N., Surati, M., Demchuk, C., Fathi, R., Salama, A.K., Husain, A.N., Hensing, T., y Salgia, R. (2011). Mind-mapping for lung cancer: towards a personalized therapeutics approach. *Advances In Therapy* 28, 1-22.
- Morillas, J.D., Castells, A., Oriol, I., Pastor, A., Pérez-Segura, P., Echevarría, J.M., Caballero, B., González-Navarro, A., Bandrés, F., Brullet, E., *et al.* (2012). [The Alliance for the Prevention of Colorectal Cancer in Spain. A civil commitment to society]. *Gastroenterol Hepatol* 35, 109-28.
- Morson, B. (1974). President's address. The polyp-cancer sequence in the large bowel. *Proceedings Of The Royal Society Of Medicine* 67, 451-7.

- Mountain, C.F. (1986). A new international staging system for lung cancer. *Chest* 89, 225S-233S.
- Mountain, C.F. (1997). Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 111, 1710-7.
- Muftuoglu, M., Wong, H.K., Imam, S.Z., 3rd, D.M., Bohr, V.A., y Opresko, P.L. (2006). Telomere repeat binding factor 2 interacts with base excision repair proteins and stimulates DNA synthesis by DNA polymerase beta. *Cancer Res.* 66, 113-24.
- Muhammad, S., Jiang, Z., Liu, Z., Kaur, K., y Wang, X. (2013). The role of EGFR monoclonal antibodies (MoABs) cetuximab/panitumab, and BRAF inhibitors in BRAF mutated colorectal cancer. *Journal Of Gastrointestinal Oncology* 4, 72-81.
- Mukherjee, S. (2012). *El Emperador de Todos Los Males* (Taurus).
- Muller, M. (2009). Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxidants & Redox Signaling* 11, 59-98.
- N**CBI CBX5 chromobox homolog 5 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
- Nakamura, K., Furugori, E., Esaki, Y., Arai, T., Sawabe, M., Okayasu, I., Fujiwara, M., Kammori, M., Mafune, K., Kato, M., *et al.* (2000). Correlation of telomere lengths in normal and cancers tissue in the large bowel. *Cancer Lett.* 158, 179-84.
- Nakanishi, H., Suda, T., Katoh, M., Watanabe, A., Igishi, T., Kodani, M., Matsumoto, S., Nakamoto, M., Shiogoka, Y., Okabe, T., *et al.* (2004). Loss of imprinting of PEG1/MEST in lung cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 12, 1273-8.
- Nawrot, T.S., Staessen, J.A., Gardner, J.P., y Aviv, A. (2004). Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* 363, 507-10.
- Nergadze, S.G., Farnung, B.O., Wischniewski, H., Khoriauli, L., Vitelli, V., Chawla, R., Giulotto, E., y Azzalin, C.M. (2009). CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. *RNA* 15, 2186-94.
- Nizami, Z.F., Deryusheva, S., y Gall, J.G. (2010). Cajal bodies and histone locus bodies in *Drosophila* and *Xenopus*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75, 313-20.
- Njajou, O.T., Cawthon, R.M., Damcott, C.M., Wu, S., Ott, S., Garant, M.J., Blackburn, E.H., Mitchell, B.D., Shuldiner, A.R., y Hsueh, W. (2007). Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 12135-9.
- Nordfjäll, K., Larefalk, A., Lindgren, P., Holmberg, D., y Roos, G. (2005). Telomere length and heredity: Indications of paternal inheritance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16374-8.
- Nordfjäll, K., Svenson, U., Norrback, K., Adolfsson, R., y Roos, G. (2010). Large-scale parent-child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length. *Eur. J. Hum. Genet.* 18, 385-9.
- O**dagiri, E., Kanada, N., Jibiki, K., Demura, R., Aikawa, E., y Demura, H. (1994). Reduction of telomeric length and c-erbB-2 gene amplification in hu-

- man breast cancer, fibroadenoma, and gynecomastia. Relationship to histologic grade and clinical parameters. *Cancer* 73, 2978-84.
- Oh, H., Wang, S.C., Prahash, A., Sano, M., Moravec, C.S., Taffet, G.E., Michael, L.H., Youker, K.A., Entman, M.L., y Schneider, M.D. (2003). Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 5378-83.
- Ohali, A., Avigad, S., Ash, S., Goshen, Y., Luria, D., Feinmesser, M., Zaizov, R., y Yaniv, I. (2006). Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer* 107, 1391-9.
- Olivier, M., Hollstein, M., y Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology* 2, a001008.
- Opresko, P.L., Kobbe, von, C., Laine, J., Harrigan, J., Hickson, I.D., y Bohr, V.A. (2002). Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J. Biol. Chem.* 277, 41110-9.
- Ouellette, M.M., Liao, M., Herbert, B.S., Johnson, M., Holt, S.E., Liss, H.S., Shay, J.W., y Wright, W.E. (2000). Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase. *J. Biol. Chem.* 275, 10072-6.
- Ouellette, M.M., Wright, W.E., y Shay, J.W. (2011). Targeting telomerase-expressing cancer cells. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1433-42.
- Ovchinnikov, D.A., Cooper, M.A., Pandit, P., Coman, W.B., Cooper-White, J.J., Keith, P., Wolvetang, E.J., Slowey, P.D., y Punyadeera, C. (2012). Tumor-suppressor Gene Promoter Hypermethylation in Saliva of Head and Neck Cancer Patients. *Transl Oncol* 5, 321-6.
- Page, G., Lödige, I., Kögel, D., y Scheidtmann, K.H. (1999). AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis. *FEBS Lett.* 462, 187-91.
- Palm, W., y de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.* 42, 301-34.
- Pancione, M., Remo, A., y Colantuoni, V. (2012). Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Pathology Research International* 2012, 509348-11.
- Pang, L.Y., y Argyle, D.J. (2009). Using naturally occurring tumours in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. *Biochim. Biophys. Acta* 1792, 380-91.
- Pao, W., y Girard, N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology* 12, 175-80.
- Passananti, C., y Fanciulli, M. (2007). The anti-apoptotic factor Che-1/AATF links transcriptional regulation, cell cycle control, and DNA damage response. *Cell Division* 2, 21.
- Passananti, C., Floridi, A., y Fanciulli, M. (2007). Che-1/AATF, a multivalent adaptor connecting transcriptional regulation, checkpoint control, and apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 85, 477-83.
- Patel, M.M., Parekh, L.J., Jha, F.P., Sainger, R.N., Patel, J.B., Patel, D.D., Shah, P.M., y Patel, P.S. (2002). Clinical usefulness of telomerase activation and telomere length in head and neck cancer. *Head & Neck* 24, 1060-7.

- Pellegrini, M., Pacini, S., y Baldari, C.T. (2005). p66SHC: the apoptotic side of Shc proteins. *Apoptosis* 10, 13-8.
- Perner, S., Brüderlein, S., Hasel, C., Wai-bel, I., Holdenried, A., Ciloglu, N., Chopurian, H., Nielsen, K.V., Plesch, A., Högel, J., *et al.* (2003). Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *Am. J. Pathol.* 163, 1751-6.
- Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S., y Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21, 7435-51.
- Pino, M.S., Pino, M.S., Chung, D.C., y Chung, D.C. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, 2059-2072.
- Podlevsky, J.D., y Chen, J.J. (2012). It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutat. Res.* 730, 3-11.
- Portugal, J., Mansilla, S., y Bataller, M. (2010). Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Current Pharmaceutical Design* 16, 69-78.
- Pérez-Gracia, J.L., López-Picazo, J.M., Martín-Algarra, S., Viteri, S., García-Foncillas, J., y Gúrpide, A. (2007). [Small-cell lung cancer]. *Rev Med Univ Navarra* 51, 7-13.
- R**ajagopalan, H., y Lengauer, C. (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature* 432, 338-41.
- Rampazzo, E., Bertorelle, R., Serra, L., Terrin, L., C, C., iotto, Pucciarelli, S., del Bianco, P.D., Nitti, D., de Rossi, A.D., *et al.* (2010). Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br. J. Cancer* 102, 1300-1305.
- Rampazzo, E., Bonaldi, L., Trentin, L., Visco, C., Keppel, S., Giunco, S., Frezzato, F., Facco, M., Novella, E., Giaretta, I., *et al.* (2012). Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica* 97, 56-63.
- Ranganathan, V., Heine, W.F., Ciccone, D.N., Rudolph, K.L., Wu, X., Chang, S., Hai, H., Ahearn, I.M., Livingston, D.M., Resnick, I., *et al.* (2001). Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr. Biol.* 11, 962-6.
- Raposo, C., Carpeño, J., y Barón, M. (2007). Factores etiológicos del cáncer de pulmón: fumador activo, fumador pasivo, carcinógenos medioambientales y factores genéticos. *Med Clin (Barc)*.
- Ravindran, J., Prasad, S., y Aggarwal, B.B. (2009). Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *The AAPS Journal* 11, 495-510.
- Redon, S., Reichenbach, P., y Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res.* 38, 5797-806.
- Riha, K., Heacock, M.L., y Shippen, D.E. (2006). The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break

- repair pathway in telomere biology. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 237-77.
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., y Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes & Cancer* **2**, 466-74.
- Rodak, B.F. (2004). *Hematología* (Ed. Médica Panamericana).
- Rodenhuis, S., Slebos, R.J., Boot, A.J., Evers, S.G., Mooi, W.J., Wagenaar, S.S., van Bodegom, P.C., y Bos, J.L. (1988). Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res.* **48**, 5738-41.
- Roos, G., Kröber, A., Grabowski, P., Kienle, D., Bühler, A., Döhner, H., Rosenquist, R., y Stilgenbauer, S. (2008). Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **111**, 2246-52.
- Rose-James, A. (2012). Molecular Markers with Predictive and Prognostic Relevance in Lung Cancer. *Lung Cancer International*.
- Rossi, A., Maione, P., Bareschino, M.A., Schettino, C., Sacco, P.C., Ferrara, M.L., Castaldo, V., y Gridelli, C. (2010). The emerging role of histology in the choice of first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer: implication in the clinical decision-making. *Current Medicinal Chemistry* **17**, 1030-8.
- Ruden, M., y Puri, N. (2012). Novel anti-cancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat. Rev.* 1-13.
- Rufer, N., Brümmendorf, T.H., Kolvraa, S., Bischoff, C., Christensen, K., Wadsworth, L., Schulzer, M., y Lansdorp, P.M. (1999). Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *The Journal Of Experimental Medicine* **190**, 157-67.
- Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury, G., Roosnek, E., y Lansdorp, P.M. (1998). Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nature Biotechnology* **16**, 743-7.
- S**accomanno, G., Archer, V.E., Auerbach, O., Saunders, R.P., y Brennan, L.M. (1974). Development of carcinoma of the lung as reflected in exfoliated cells. *Cancer* **33**, 256-70.
- Safont, M.J., Gil, M., Sirera, R., Jantus-Lewintre, E., Sanmartín, E., Gallach, S., Caballero, C., del Pozo, N., Palomares, E., y Camps, C. (2011). The prognostic value of hTERT expression levels in advanced-stage colorectal cancer patients: a comparison between tissue and serum expression. *Clinical & Translational Oncology : Official Publication Of The Federation Of Spanish Oncology Societies And Of The National Cancer Institute Of Mexico* **13**, 396-400.
- Saharia, A., Teasley, D.C., Duxin, J.P., Dao, B., Chiappinelli, K.B., y Stewart, S.A. (2010). FEN1 ensures telomere stability by facilitating replication fork re-initiation. *J. Biol. Chem.* **285**, 27057-66.
- Salon, C., Eymin, B., Micheau, O., Chaperot, L., Plumas, J., Brambilla, C., Brambilla, E., y Gazzeri, S. (2006). E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through

- specific downregulation of c-FLIP(short). *Cell Death Differ.* **13**, 260-72.
- Samassekou, O., Gadj, M., Drouin, R., y Yan, J. (2010). Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Annals Of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* **192**, 284-291.
- Samassekou, O., Ntwari, A., Hébert, J., y Yan, J. (2009). Individual telomere lengths in chronic myeloid leukemia. *Neoplasia* **11**, 1146-54.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3 Volume Set) (Cold Spring Harbor Laboratory Pr).
- Sandell, L.L., y Zakian, V.A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**, 729-39.
- Sanz-Casla, M.T., Vidaurreta, M., Sanchez-Rueda, D., Maestro, M.L., Arroyo, M., y Cerdán, F.J. (2005). Telomerase activity as a prognostic factor in colorectal cancer. *Onkologie* **28**, 553-7.
- Scherthan, H., Weich, S., Schwegler, H., Heyting, C., Härle, M., y Cremer, T. (1996). Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J. Cell Biol.* **134**, 1109-25.
- Schoeftner, S., y Blasco, M.A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* **10**, 228-36.
- Schwerk, C., y Schulze-Osthoff, K. (2005). Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **19**, 1-13.
- Selvaggi, G., Novello, S., Torri, V., Leonardo, E., de Giuli, P., Borasio, P., Mossetti, C., Ardisson, F., Lausi, P., y Scagliotti, G.V. (2004). Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **15**, 28-32.
- Sharma, M. (2013). Apoptosis-antagonizing transcription factor (AATF) gene silencing: role in induction of apoptosis and down-regulation of estrogen receptor in breast cancer cells. *Biotechnology Letters* **35**, 1561-70.
- Shay, J.W., y Wright, W.E. (2000). Implications of mapping the human telomerase gene (hTERT) as the most distal gene on chromosome 5p. *Neoplasia* **2**, 195-6.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., y Wright, W.E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* **196**, 33-9.
- Shay, J.W., y Wright, W.E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* **26**, 867-74.
- Shay, J.W., Reddel, R.R., y Wright, W.E. (2012). Cancer. Cancer and telomeres--an ALTernative to telomerase. *Science* **336**, 1388-90.
- Shay, J.W., y Wright, W.E. (2010). Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett.* **584**, 3819-3825.
- Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N.S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., *et al.* (2007). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different sub-

- classes of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 18654-9.
- Shirotani, Y., Hiyama, K., Ishioka, S., Inyaku, K., Awaya, Y., Yonehara, S., Yoshida, Y., Inai, K., Hiyama, E., y Hasegawa, K. (1994). Alteration in length of telomeric repeats in lung cancer. *Lung Cancer* *11*, 29-41.
- Siafakas, A.R., y Richardson, des, R. (2009). Growth arrest and DNA damage-45 alpha (GADD45alpha). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 986-9.
- Simon, N.M., Smoller, J.W., McNamara, K.L., Maser, R.S., Zalta, A.K., Pollack, M.H., Nierenberg, A.A., Fava, M., y Wong, K. (2006). Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. *Biol. Psychiatry* *60*, 432-5.
- Simsek, B.C., Pehlivan, S., y Karaoglu, A. (2010). Human telomerase reverse transcriptase expression in colorectal tumors: correlations with immunohistochemical expression and clinicopathologic features. *Ann Diagn Pathol* *14*, 413-7.
- Singhapol, C., Pal, D., Czapiewski, R., Porika, M., Nelson, G., y Saretzki, G.C. (2013). Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis. *Plos ONE* *8*, e52989.
- Sinicrope, F.A., Rego, R.L., Halling, K.C., Foster, N., Sargent, D.J., Plant, B.L., French, A.J., Laurie, J.A., Goldberg, R.M., Thibodeau, S.N., *et al.* (2006). Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology* *131*, 729-37.
- Skillrud, D.M., Offord, K.P., y Miller, R.D. (1986). Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann. Intern. Med.* *105*, 503-7.
- Slagboom, P.E., Droog, S., y Boomsma, D.I. (1994). Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am. J. Hum. Genet.* *55*, 876-82.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G., y de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 1659-68.
- Steensel, B., Smogorzewska, A., y de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* *92*, 401-13.
- Steinert, S., Shay, J.W., y Wright, W.E. (2000). Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *273*, 1095-8.
- Stengel, K.R., Thangavel, C., Solomon, D.A., Angus, S.P., Zheng, Y., y Knudsen, E.S. (2009). Retinoblastoma/p107/p130 pocket proteins: protein dynamics and interactions with target gene promoters. *J. Biol. Chem.* *284*, 19265-71.
- Stern, J.L., Zyner, K.G., Pickett, H.A., Cohen, S.B., y Bryan, T.M. (2012). Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 2384-95.
- Stewart, J.A., Chaiken, M.F., Wang, F., y Price, C.M. (2012). Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat. Res.* *730*, 12-9.
- Suen, K.M., Lin, C., George, R., Melo, F.A., Biggs, E.R., Ahmed, Z., Drake,

- M.N., Arur, S., Arold, S.T., y Ladbury, J.E. (2013). Interaction with Shc prevents aberrant Erk activation in the absence of extracellular stimuli. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 620-7.
- Surrallés, J., Hande, M.P., Marcos, R., y Lansdorp, P.M. (1999). Accelerated telomere shortening in the human inactive X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* *65*, 1617-22.
- T**akayama, T., Katsuki, S., Takahashi, Y., Ohi, M., Nojiri, S., Sakamaki, S., Kato, J., Kogawa, K., Miyake, H., y Niitsu, Y. (1998). Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N. Engl. J. Med.* *339*, 1277-84.
- Takubo, K., Aida, J., Izumiyama-Shimomura, N., Ishikawa, N., Sawabe, M., Kurabayashi, R., Shiraishi, H., Arai, T., y Nakamura, K. (2010). Changes of telomere length with aging. *Geriatrics & Gerontology International* *10 Suppl 1*, S197-206.
- Takubo, K., Izumiyama-Shimomura, N., Honma, N., Sawabe, M., Arai, T., Kato, M., Oshimura, M., y Nakamura, K. (2002). Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp. Gerontol.* *37*, 523-31.
- Tamakawa, R.A., Fleisig, H.B., y Wong, J.M. (2010). Telomerase inhibition potentiates the effects of genotoxic agents in breast and colorectal cancer cells in a cell cycle-specific manner. *Cancer Res.* *70*, 8684-94.
- Tang, X., Khuri, F.R., Lee, J.J., Kemp, B.L., Liu, D., Hong, W.K., y Mao, L. (2000). Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 1511-6.
- Targowski, T., Jahnz-Rózyk, K., Szkoda, T., Plusa, T., y From, S. (2008). Telomerase activity in transthoracic fine-needle biopsy aspirates from non-small cell lung cancer as prognostic factor of patients' survival. *Lung Cancer* *61*, 97-103.
- Tatsumoto, N., Hiyama, E., Murakami, Y., Imamura, Y., Shay, J.W., Matsuura, Y., y Yokoyama, T. (2000). High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* *6*, 2696-701.
- Tejera, A.M., d'Alcontres, M.S., Thanassoula, M., Marion, R.M., Martinez, P., Liao, C., Flores, J.M., Tarsounas, M., y Blasco, M.A. (2010). TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice. *Dev. Cell* *18*, 775-89.
- Teo, H., Ghosh, S., Luesch, H., Ghosh, A., Wong, E.T., Malik, N., Orth, A., de Jesus, P., Perry, A.S., Oliver, J.D., *et al.* (2010). Telomere-independent Rap1 is an IKK adaptor and regulates NF-kappaB-dependent gene expression. *Nat. Cell Biol.* *12*, 758-67.
- Terrin, L., Rampazzo, E., Pucciarelli, S., Agostini, M., Bertorelle, R., Esposito, G., DelBianco, P., Nitti, D., y de Rossi, A. (2008). Relationship between tumor and plasma levels of hTERT mRNA in patients with colorectal cancer: implications for monitoring of neoplastic disease. *Clin. Cancer Res.* *14*, 7444-51.
- Tessema, M., Yu, Y.Y., Stidley, C.A., Machida, E.O., Schuebel, K.E., Baylin, S.B., y Belinsky, S.A. (2009). Concomi-

- tant promoter methylation of multiple genes in lung adenocarcinomas from current, former and never smokers. *Carcinogenesis* **30**, 1132-8.
- Testa, J.R., y Siegfried, J.M. (1992). Chromosome abnormalities in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* **52**, 2702s-2706s.
- Tiberi, L., Faisal, A., Rossi, M., Di Tella, L.D., Franceschi, C., y Salvioli, S. (2006). p66Shc gene has a pro-apoptotic role in human cell lines and it is activated by a p53-independent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 503-508.
- Tomlinson, R.L., Li, J., Culp, B.R., Terns, R.M., y Terns, M.P. (2010). A Cajal body-independent pathway for telomerase trafficking in mice. *Exp. Cell Res.* **316**, 2797-809.
- Tong, T., Ji, J., Jin, S., Li, X., Fan, W., Song, Y., Wang, M., Liu, Z., Wu, M., y Zhan, Q. (2005). Gadd45a expression induces Bim dissociation from the cytoskeleton and translocation to mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4488-500.
- Torre, D.L., Aguenouz, M., Conti, A., Giusa, M., Raffa, G., Abbritti, R.V., Germano, A., y Angileri, F.F. (2011). Potential clinical role of telomere length in human glioblastoma. *Translational Medicine @ Unisa* **1**, 243-70.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., y Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 8681-6.
- Tront, J.S., Huang, Y., Fornace, A.J., Jr, Fornace, A.A., Jr, Hoffman, B., y Liebermann, D.A. (2010). Gadd45a functions as a promoter or suppressor of breast cancer dependent on the oncogenic stress. *Cancer Res.* **70**, 9671-81.
- Tropp, B.E. (2011). *Molecular Biology: Genes to Proteins*, Fourth Edition (Jones & Bartlett Learning).
- Turnbull, R.B., Jr, Kyle, K., Watson, F.R., y Spratt, J. (1967). Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann. Surg.* **166**, 420-7.
- Turner-Warwick, M., Lebowitz, M., Burrows, B., y Johnson, A. (1980). Cryptogenic fibrosing alveolitis and lung cancer. *Thorax* **35**, 496-9.
- Tycowski, K.T., Shu, M., Kukoyi, A., y Steitz, J.A. (2009). A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Mol. Cell* **34**, 47-57.
- Vaissière, T., Hung, R.J., Zaridze, D., Moukeria, A., Cuenin, C., Fasolo, V., Ferro, G., Paliwal, A., Hainaut, P., Brennan, P., *et al.* (2009). Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res.* **69**, 243-52.
- Valdes, A.M., Andrew, T., Gardner, J.P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L.F., Aviv, A., y Spector, T.D. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* **366**, 662-4.
- Valerie, K., y Povirk, L.F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* **22**, 5792-812.
- Valls, C., Piñol, C., Reñé, J.M., Buenestado, J., y Viñas, J. (2011). Telomere length is a prognostic factor for overall survival in colorectal cancer. *Colorectal Dis* **13**, 1265-72.

- Varela, E., y Blasco, M.A. (2010). 2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine: telomeres and telomerase. *Oncogene* 29, 1561-1565.
- Vasa-Nicotera, M., Brouillette, S., Mangino, M., Thompson, J.R., Braund, P., Clemitson, J., Mason, A., Bodycote, C.L., Raleigh, S.M., Louis, E., *et al.* (2005). Mapping of a major locus that determines telomere length in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 147-51.
- Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B., y Lansdorp, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9857-60.
- Vega, L.R., Mateyak, M.K., y Zakian, V.A. (2003). Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 948-59.
- Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., y Artandi, S.E. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 323, 644-8.
- Venteicher, A.S., Meng, Z., Mason, P.J., Veenstra, T.D., y Artandi, S.E. (2008). Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell* 132, 945-57.
- Ventura, A., Kirsch, D.G., McLaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L., Newman, J., Reczek, E.E., Weissleder, R., y Jacks, T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661-5.
- Verdun, R.E., y Karlseder, J. (2007). Replication and protection of telomeres. *Nature* 447, 924-31.
- Vidaurreta, M., Maestro, M., Rafael, S., Veganzones, S., Sanz-Casla, M., Cerdán, J., y Arroyo, M. (2007). Telomerase activity in colorectal cancer, prognostic factor and implications in the microsatellite instability pathway. *World J. Gastroenterol.* 13, 3868-72.
- Vrbsky, J., Akimcheva, S., Watson, J.M., Turner, T.L., Daxinger, L., Vyskot, B., Aufsatz, W., y Riha, K. (2010). siRNA-mediated methylation of Arabidopsis telomeres. *Plos Genet.* 6, e1000986.
- Vulliamy, T., Marrone, A., Dokal, I., y Mason, P.J. (2002). Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA. *Lancet* 359, 2168-70.
- Végran, F., Rebucci, M., Chevrier, S., Cadouot, M., Boidot, R., y Lizard-Nacol, S. (2013). Only missense mutations affecting the DNA binding domain of p53 influence outcomes in patients with breast carcinoma. *Plos ONE* 8, e55103.
- Wan, Y., y Wu, X. (2012). [Expression and clinical significance of DAPK1 and CD147 in esophageal squamous cell carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* [Chinese Journal Of Oncology] 34, 44-8.
- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciú, P., Cech, T.R., y Lei, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445, 506-10.
- Wang, S., Wang, W., Chang, Y., Wu, C., Chao, Y., Kao, S., Yuan, A., Lin, C., Yang, S., Chan, W., *et al.* (2009). p53 controls cancer cell invasion by inducing

- the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat. Cell Biol.* *11*, 694-704.
- Wang, W., Kuo, J., Yao, C., y Chen, R. (2002). DAP-kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals. *J. Cell Biol.* *159*, 169-79.
- Wang, Y., Sharpless, N., y Chang, S. (2013). p16INK4a protects against dysfunctional telomere-induced ATR-dependent DNA damage responses. *The Journal Of Clinical Investigation* *123*, 4489-501.
- Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New Biology* *239*, 197-201.
- Weischer, M., Nordestgaard, B.G., Cawthon, R.M., Freiberg, J.J., Tybjaerg-Hansen, A., y Bojesen, S.E. (2013). Short telomere length, cancer survival, and cancer risk in 47102 individuals. *J. Natl. Cancer Inst.* *105*, 459-68.
- Wen, J., Fu, J., Zhang, W., y Guo, M. (2011). Genetic and epigenetic changes in lung carcinoma and their clinical implications. *Modern Pathology : An Official Journal Of The United States And Canadian Academy Of Pathology, Inc* *24*, 932-43.
- Worthley, D.L., y Leggett, B.A. (2010). Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical Biochemist. Reviews / Australian Association Of Clinical Biochemists* *31*, 1-8.
- Wright, W.E., Shay, J.W., y Piatyszek, M.A. (1995). Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res.* *23*, 3794-5.
- Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D., y Shay, J.W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.* *11*, 2801-9.
- Wu, B., Yao, H., Wang, S., y Xu, R. (2013). DAPK1 modulates a curcumin-induced G2/M arrest and apoptosis by regulating STAT3, NF- κ B, and caspase-3 activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 75-80.
- Wu, P.C., Wang, Q., Grobman, L., Chu, E., y Wu, D.Y. (2012). Accelerated cellular senescence in solid tumor therapy. *Experimental Oncology* *34*, 298-305.
- Wu, P., van Overbeek, M., Rooney, S., y de Lange, T. (2010). Apollo contributes to G overhang maintenance and protects leading-end telomeres. *Mol. Cell* *39*, 606-17.
- Wu, T., Lin, P., Hsu, C., Huang, Y., Chen, C., Chung, W., Lee, H., y Ko, J. (2003). Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. *Lung Cancer* *41*, 163-9.
- Wyatt, H.D., West, S.C., y Beattie, T.L. (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* *38*, 5609-22.
- X**in, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M.S., y Songyang, Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* *445*, 559-62.
- Xing, J., Stewart, D.J., Gu, J., Lu, C., Spitz, M.R., y Wu, X. (2008). Expression of methylation-related genes is associated with overall survival in patients with non-small cell lung cancer. *Br. J. Cancer* *98*, 1716-22.

- Xu, Y., Hu, B., Choi, A., Gopalan, B., Lee, B.H., Kalady, M.F., Church, J.M., y Ting, A.H. (2012). Unique DNA methylome profiles in CpG island methylator phenotype colon cancers. *Genome Res.* 22, 283-91.
- Xu, Z.Y., Blot, W.J., Xiao, H.P., Wu, A., Feng, Y.P., Stone, B.J., Sun, J., Ershow, A.G., Henderson, B.E., y Fraumeni, J.F. (1989). Smoking, air pollution, and the high rates of lung cancer in Shenyang, China. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1800-6.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickinson, R.A., Hernandez, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., y Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-60.
- Y**an, J., Yun, H., Yang, Y., Jing, B., Feng, C., y Song-bin, F. (2006). Upregulation of BNIP3 promotes apoptosis of lung cancer cells that were induced by p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 501-7.
- Yang, F., Zhang, W., Li, D., y Zhan, Q. (2013). Gadd45a suppresses tumor angiogenesis via inhibition of the mTOR/STAT3 protein pathway. *J. Biol. Chem.* 288, 6552-60.
- Yang, S.Y., Sales, K.M., Fuller, B., Seifalian, A.M., y Winslet, M.C. (2009). Apoptosis and colorectal cancer: implications for therapy. *Trends Mol Med* 15, 225-33.
- Yatabe, Y., Borczuk, A.C., y Powell, C.A. (2011). Do all lung adenocarcinomas follow a stepwise progression? *Lung Cancer* 74, 7-11.
- Ye, M., Liu, J., Lu, Z., Zhao, Y., Liu, S., Li, L., Tan, M., Weng, X., Li, W., y Cao, Y. (2005). Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens*, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis in vitro. *FEBS Lett.* 579, 3437-43.
- Yoo, H.J., Byun, H., Kim, B., Lee, K.H., Park, S., y Rho, S.B. (2012). DAPk1 inhibits NF- κ B activation through TNF- α and INF- γ -induced apoptosis. *Cell. Signal.* 24, 1471-7.
- Yuan, J., y Kroemer, G. (2010). Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev.* 24, 2592-602.
- Z**glinicki, von, T., Saretzki, G., Döcke, W., y Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp. Cell Res.* 220, 186-93.
- Zglinicki, von, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends In Biochemical Sciences* 27, 339-44.
- Zhan, Q., Bae, I., Kastan, M.B., y Fornace, A.J., Jr (1994). The p53-dependent gamma-ray response of GADD45. *Cancer Res.* 54, 2755-60.
- Zhang, H., Zhu, Z., Feng, Z., Li, X., Li, M., Ma, J., y Liang, N. (2004). [Effect of DAPK1 gene transfection on high-metastasis non-small lung cancer cell PGCl3]. *Ai Zheng* 23, 497-501.
- Zhao, Y., Sfeir, A.J., Zou, Y., Buseman, C.M., Chow, T.T., Shay, J.W., y Wright, W.E. (2009). Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell* 138, 463-75.
- Zhou, X.Z., y Lu, K.P. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is

a potent telomerase inhibitor. *Cell* 107, 347-59.

Zhu, C., Cutz, J., Liu, N., Lau, D., Shepherd, F.A., Squire, J.A., y Tsao, M. (2006). Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 94, 1452-9.

Zhu, X.D., Küster, B., Mann, M., Petrini, J.H., y de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* 25, 347-52.

Zhu, Y., Tomlinson, R.L., Lukowiak, A.A., Terns, R.M., y Terns, M.P. (2004). Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Mol. Biol. Cell* 15, 81-90.

Ziffle, J.A., Baerlocher, G.M., y Lansdorp, P.M. (2003). Telomere length in subpopulations of human hematopoietic cells. *Stem Cells* 21, 654-60.

Zvereva, M.I., Shcherbakova, D.M., y Dontsova, O.A. (2010). Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry. Biokhimiia* 75, 1563-83.

7. Recursos electrónicos y otros servicios

- <http://www.aacr.org/home/public--media/aacr-in-the-news.aspx?d=2341>.
- <http://www.aemps.gob.es/>
- <http://www3.appliedbiosystems.com/>
- <http://www.cancer.gov/>
- <http://www.cancer.org>
- <http://www.fabis.org/>
- http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2009/
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
- <http://www-p53.iarc.fr/>
- <https://www.roche-applied-science.com>
- www.ucm.es
- MedicineNet.com. Lung Cancer glossary of terms.
- Centro de Genómica y Proteómica, Unidad de Genómica, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid (ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real). <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/gyp/genomica/>

Summary

Telomeres and factors of senescence and cell death in non-small cell lung cancer and colorectal cancer. Tamara Fernández Marcelo. Madrid, 2014.

Background and aims:

Telomeres, the repeated nucleoprotein structures found at the end of linear chromosomes, preserve chromosome structure and function and are continuously lost in a way that is coupled to cell division (1). When telomeres become critically short, cells activate senescence and cell death programs in order to limit the progression of genetically unstable clones (2). However, tumour cells are able to re-activate the telomerase enzyme to maintain telomere length and guarantee cell viability (1). The acquisition of the immortal phenotype, due to telomerase reactivation, and the failure of senescence and cell death programs, represent a favourable landscape for tumour cells. However, the function of senescence and cell death pathways in response to short telomeres could be considered as a factor which limits tumour progression. Differences in how these pathways operate between Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) and Colorectal Cancer (CRC) could explain the different clinical outcome that shortening telomere reflects, as previous results from our group showed (3&4).

Our **aims** in this work consist of:

- validating the prognosis role of telomere length and telomerase activity in NSCLC and CRC;
- evaluating differences in the expression profile of senescence and cell death factors, between NSCLC and CRC, in response to short telomeres
- and investigating whether a differential expression of factors related to these pathways could determinate differential patient outcome conferred by telomere status in NSCLC and CRC.

Material and methods:

We analyzed 68 NSCLCs, 60 CRCs, and their corresponding control tissues samples obtained from patients who underwent surgery at San Carlos Hospital in Madrid, Spain. These cases were collected without selection in function of gender, age or stage. The median follow-up period for patients was 5 years. For prognosis studies, NSCLCs and CRCs populations were incorporated to the databases of 135 and 100 cases, respectively, available in our research group, in order to increase the statistical power. The primary outcome used for the prognosis studies was Disease-Free

Survival (DFS), calculated from the day of surgery until recurrence. Survival analyses were done by the Kaplan-Meier method and differences were evaluated with the Log-Rank test. Only patients who had undergone potentially curative surgery were considered. Multivariate analysis was performed using the Cox proportional hazard model to identify which independent factors jointly had a significant influence on survival. Cutoff Finder web application (5) was used to determine optimal cutoff values.

We evaluated telomere function by analysing telomerase activity and telomere length: the first was established by the TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) assay and the second, by the terminal restriction fragment (TRF) length method, in tumours and control tissues. The ratio of telomere length in cancer to control tissue was defined as T/N ratio.

Differential expression of factors related to senescence and cell death pathways was evaluated using microarrays containing a total of 113 oligonucleotide sequences corresponding to genes from these pathways (Oligo GEArray® Human p53 Signaling Pathway Microarray, OHS-027). Also, using microarrays, we investigated expression profiles of 113 genes representative of 6 biological pathways involved in transformation and tumorigenesis (Oligo GEArray® Human Cancer PathwayFinder, OHS-033).

We compared the gene expression profile of NSCLCs *vs.* CRCs, with telomere shortening. To normalize results, we referred expression data obtained from these genes to expression of housekeeping *GAPDH*, also included in the arrays. Array data were analysed using the GEArray Expression Analysis Suite (GEASuite) (SuperArray Bioscience Corporation).

Expression data from arrays were validated investigating gene expression by Real Time Quantitative PCR (qRT-PCR), using Taqman probes (FAM TM dye-labeled TaqMan® MGB probes, Applied Biosystems) following the manufacturer's instructions. The study was performed for those genes showing high (≥ 6 fold difference) and significantly overexpression after comparing NSCLCs *vs.* CRCs, with telomere shortening, in the array analysis. The comparative threshold cycle (Ct) method was used to calculate the relative expression. For quantification of gene expression, the target genes values were normalized to the expression of the endogenous reference (*GAPDH*). Also, the amount of target, normalized to *GAPDH* and relative to a calibrator (normal pool expression, obtained from the corresponding normal samples for each case) is given by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification, RQ). ($\Delta Ct = Ct_{(target\ gene)} - Ct_{(GAPDH)}$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(for\ any\ sample)} - \Delta Ct_{(for\ the\ calibrator)}$). IBM SPSS (*Statistical Package for social science*) Statistics 19 was used for statistical analyses.

Results:

In relation to NSCLC population, positive results for telomerase activity were found in 61 (89.7%) of 68 cases. Seven (10.3%) tumours were telomerase negative. The mean telomere length (mean \pm typical error) was 4.51 ± 0.33 Kb in NSCLCs and 5.44 ± 0.32 Kb, for non-tumour samples ($P < 0.001$; Student's t-Tests). Telomere length in tumour samples significantly correlated with telomere length in the paired normal samples (Pearson's correlation = 0.862; $P < 0.001$). The mean telomere length ratio T/N was 0.83 ± 0.029 . Regarding survival analysis, patients which tumours showed a telomere length < 7.29 or T/N ratio < 0.97 had a significantly poor clinical evolution ($P = 0.034$ and 0.040 , respectively, Log-Rank). In multivariate analysis, both parameters proved to be of independent prognostic markers. Kaplan-Meier curves showed that telomerase activity resulted a predictor of poor clinical outcome ($P = 0.028$, Log-Rank).

Considering CRC population, positive results for telomerase activity were found in 51 (85%) of 60 cases. Nine (15%) were telomerase negative. The mean telomere length was 3.80 ± 0.18 Kb in CRCs, and 5.41 ± 0.28 Kb, for non-tumour samples ($P < 0.001$; Student's t-Tests). Telomere length in tumour samples significantly correlated with telomere length in the paired normal samples (Pearson's correlation = 0.445; $P = 0.001$). The mean telomere length ratio T/N was 0.74 ± 0.03 . In relation to survival analyses, patients which tumours showed a telomere length > 6.35 Kb or T/N ratio > 0.665 had a significantly poor clinical evolution ($P < 0.001$ and 0.043 , respectively). In multivariate analysis, both parameters proved to be of independent prognostic markers.

We wanted to establish whether the differences in clinical outcome in NSCLC and CRC, in relation to telomere length, could be explained as being a result of differences in how pathways of senescence and cell death operate between NSCLC and CRC. First, we compared the gene expression profile of NSCLCs *vs.* CRCs, with telomere shortening, in a subpopulation of each tumour type, using microarrays. Microarray data indicated that a number of genes showed a significantly (P -value ≤ 0.01) overexpression, in NSCLCs, compared with CRCs, with telomere shortening, after *GAPDH* normalization. The most outstanding results, significant overexpression higher than six-fold, were obtained for the following seven genes: **AATF** (*apoptosis antagonizing transcription factor*), **BNIP3** (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*), **DAPK1** (*death-associated protein kinase 1*), **GADD45A** (*growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha*), **NDRG1** (*N-myc downstream regulated gene*), **SHC1** (*SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1*) and **EGFR** (*epidermal growth factor receptor*). In order to validate these results, qRT-PCR was performed for the seven genes mentioned above in all the tumour samples. Moreover, we included *TP53* (tu-

mour protein p53) and *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) due to their important roles in apoptosis and senescence pathways. Also, we evaluated the gene expression profile in a normal pool obtained from the corresponding normal samples, for each tumour type. ΔC_t values were used following the same comparative analysis as arrays screening. We detected significant differential expression values for *BNIP3*, *DAPK1*, *GADD45A*, *NDRG1*, *EGFR*, *CDKN2A* and *SHC1*, between NSCLCs and CRCs with telomere shortening (P-values, < 0.001, 0.001, 0.003, <0.001, <0.001, <0.001 and 0.051, respectively). Transcriptional expression for all these genes was higher in NSCLCs, with regard to CRCs, both with telomere shortening, after *GAPDH* normalization. Finally, transcriptional expression for *TP53* was significantly higher in CRCs with telomere shortening, with respect to NSCLCs with telomere shortening (P-value < 0.001). Our results demonstrated molecular differences between NSCLCs and CRCs, with telomere shortening. Interestingly, when $\Delta\Delta C_t$ values were considered, the difference of *AATF*, *DAPK1*, *GADD45A*, *SHC1* and *TP53* expression between tumours and pool of control samples was significantly lower in CRCs than NSCLCs, both with telomere shortening.

Finally, we separated out these gene expression results depending on telomerase activity, telomere status and clinical variables, for each tumour type subject of our investigation. A significant association was found between telomere status, in NSCLCs, and *DAPK1* and *AATF* expression (P = 0.048 and 0.02; respectively; U of Mann-Whitney): tumours with shortest telomeres exhibited a significantly diminished expression of *DAPK1* and *AATF* mRNA. Due to their important roles in cell death, *DAPK1* protein expression was analyzed by Western-blot, and correlated with mRNA levels. In NSCLC, *TP53* expression was significantly related with TNM I stage and no lymph node involvement. *DAPK1* expression was inversely related with tumour size and *EGFR* expression was statistically associated with NSCLCs recurrence.

Conclusion:

Telomere status represents a prognostic marker in non-small cell lung cancer and colorectal cancer. Differential expression profile of factors related to senescence and cell death, among both tumour types, could molecularly explain the different clinical outcome which telomere status confers.

References:

- (1). Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R., y Yan, J. (2010). Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Annals Of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 192, 284-291.
- (2). Deng, Y., Chan, S.S., y Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nature Reviews. Cancer* 8, 450-8.
- (3). Frías, C., García-Aranda, C., de Juan, C., Morán, A., Ortega, P., Gómez, A., Hernando, F., López-Asenjo, J., Torres, A., Benito, M., *et al.* (2008). Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 60, 416-25.
- (4). Garcia-Aranda, C., de Juan, C., Diaz-Lopez, A., Sanchez-Pernaute, A., Torres, A., Diaz-Rubio, E., Balibrea, J., Benito, M., y Iniesta, P. (2006). Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer* 106, 541-51.
- (5). Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B.V., Györfy, B., Schmitt, W.D., Darb-Esfahani, S., y Denkert, C. (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *Plos ONE* 7, e51862.

